

Responsmarkører for immundempende behandling hos transplanterte

*Utvikling av metode for
kvantifisering av immuncellers aktiveringskapasitet*

Masteroppgave i farmakologi

Hanne Fiskvik Fleiner



Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Avdeling for medisinsk biokjemi

Oslo universitetssykehus

20. november 2010

Forord

Mastergradsprosjektet ble gjennomført i perioden august 2009 til november 2010, ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet. Min eksterne veileder var Nils Tore Vethe. Interne veiledere ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo var Stein Bergan og Anders Åsberg.

Det er litt sørgmodig at tiden på Rikshospitalet nå er et tilbakelagt kapittel. Jeg sitter igjen med gode minner om et hyggelig og inkluderende sosialt miljø og ikke minst spennende faglig arbeid. Jeg har lært utrolig mye i denne perioden.

Jeg vil gjerne rette en stor takk til Nils Tore. Jeg kunne ikke ha fått en mer kunnskapsrik, positiv, motiverende og pedagogisk dyktig veileder.

Jeg vil også takke Stein som alltid viser interessert for hvordan ting går, og som har bidratt sterkt med faglige innspill.

For det inkluderende og gode sosiale miljøet vil jeg også gjerne takke Ingjerd, Sara, Randi, Ingrid, Ali og alle bioingeniørene på SAFE.

Til slutt vil jeg takke Roald, Maja og Johanna for deres støtte gjennom studietiden. Takk for at dere har holdt ut med en til tider travel mamma.

Hanne Fiskvik Fleiner

Oslo, november 2010

Innhold

| | |
|--|----|
| Forkortelser | 5 |
| Sammendrag..... | 7 |
| 1. Innledning..... | 9 |
| 1.1 Organtransplantasjon | 9 |
| 1.2 Immunrespons..... | 10 |
| 1.2.1 Vevsforlikelighet..... | 10 |
| 1.2.2 Immunceller og deres funksjon..... | 11 |
| 1.2.3 Aktiveringsmekanismer | 12 |
| 1.2.4 Immunologiske prinsipper for avstøtning | 14 |
| 1.3 Immundependende legemidler | 16 |
| 1.3.1 Farmakoterapi, farmakokinetikk og farmakodynamikk..... | 16 |
| 1.3.2 Terapeutisk legemiddelmonitorering | 20 |
| 1.4 Prinsipper for ex vivo aktivering av immunceller | 22 |
| 1.4.1 Aktivering via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene..... | 22 |
| 1.4.2 Phytohemagglutinin | 23 |
| 1.4.3 Andre mitogener | 24 |
| 1.5 Biomarkører..... | 24 |
| 1.5.1 Adenosin 5`-trifosfat | 25 |
| 1.5.2 WST-1 | 25 |
| 1.5.3 Purinbaser..... | 25 |
| 1.5.4 IMPDH-aktivitet | 27 |
| 1.6 Celletyper..... | 27 |
| 2. Hensikt..... | 28 |
| 3. Materialer | 29 |
| 3.1 Utstyr | 29 |
| 3.2 Reagenser..... | 32 |
| 4. Metoder | 36 |
| 4.1 Metodeutvikling..... | 36 |
| 4.2 Ex vivo aktivering av isolerte PBMC | 37 |
| 4.2.1 Celleisolering | 37 |
| 4.2.2 Aktivering med phytohemagglutinin | 38 |

| | |
|---|----|
| 4.3 Ex vivo aktivering av T-celler i fullblod | 38 |
| 4.3.1 Behandling av fullblod..... | 38 |
| 4.3.2 Aktivering via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene og etterfølgende isolering av CD4+ celler..... | 38 |
| 4.3.3 Aktivering med phytohemagglutinin og etterfølgende isolering av CD4+ celler.... | 40 |
| 4.4 Ex vivo aktivering av isolerte CD4+ celler | 41 |
| 4.4.1 Celleisolering | 41 |
| 4.4.2 Aktivering via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene..... | 42 |
| 4.5 Kvantifisering av molekulære markører | 43 |
| 4.5.1 Adenosin 5'-trifosfat | 43 |
| 4.5.2 WST-1 | 45 |
| 4.5.3 Purinbaser og IMPDH-aktivitet | 46 |
| 4.6 Aktiveringskapasitet | 50 |
| 5. Resultater..... | 51 |
| 5.1 Pålitelighet av kvantifiseringsmetoder | 51 |
| 5.1.1 ATP-avhengig luminescens | 51 |
| 5.1.2 Purinbaser målt ved LC-MS/MS..... | 54 |
| 5.1.3 Mitokondriell dehydrogenaseaktivitet (WST-1)..... | 55 |
| 5.2 Utprøving av aktiveringsmetoder | 58 |
| 5.2.1 Aktivering av isolerte PBMC..... | 58 |
| 5.2.2 Aktivering i fortynnet fullblod..... | 60 |
| 5.2.3 Aktivering av isolerte CD4+ celler via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene | 64 |
| 5.4 Utprøving av immundempende legemidlers effekt på aktiveringskapasitet..... | 69 |
| 6. Diskusjon..... | 72 |
| 6.1 Utprøving av metodene..... | 72 |
| 6.2 Utprøving av immundempende legemidlers effekt på aktiveringskapasitet..... | 75 |
| 7. Konklusjon | 77 |
| Kildeliste | 78 |

Forkortelser

| | |
|----------------------|--|
| ATP | - adenosin 5'-trifosfat |
| APC | - antigenpresenterende celle |
| AUC | - arealet under kurven (konsentrasjon vs.tid-kurve) |
| AUC _{0-4h} | - arealet under kurven fra 0 til 4 timer etter dose |
| AUC _{0-12h} | - arealet under kurven fra 0 til 12 timer etter dose |
| BPAP | - biopsi-proven acute rejection / akutt avstøtning påvist ved biopsi |
| BSA | - bovint serum albumin |
| C ₀ | - konsentrasjonen ved tid 0 (rett før neste dose) |
| CD | - cluster of differentiation |
| CD3 | - cluster of differentiation 3 |
| CD4 | - cluster of differentiation 4 |
| CD4+ celler | - celler som uttrykker CD4 |
| CD28 | - cluster of differentiation 28 |
| C _{max} | - maksimum konsentrasjon |
| C _{min} | - minimum konsentrasjon |
| CNI | - kalsineurinhemmer |
| CPS | - counts per second / antall per sekund |
| CYP | - cytokrom P450 |
| DNA | - deoksyribonukleinsyre |
| EDTA | - etylendiamintetraeddiksyre |
| FBS | - føtalt bovint serum |
| FCS | - føtalt kalve serum |
| HLA | - humant leukocyt antigen |
| HPLC | - high performance liquid chromatography (væskekromatografi) |
| IFN γ | - interferon gamma |
| IL-2 | - interleukin-2 |
| IL-2R | - interleukin-2-reseptor |
| IMPDH | - inosinmonofosfat dehydrogenase |
| KCl | - kaliumklorid |
| LC | - liquid chromatography / væskekromatografi |
| LC-MS/MS | - væskekromatografi koplet til tandem massespektrometri |
| m/z | - masse/ladning |

| | |
|------------------|---|
| MHC | - the major histocompatibility complex |
| MPA | - mykofenolsyre (mykofenolat) |
| mRNA | - messenger/budbringer ribonukleinsyre |
| MS | - massespektrometri |
| mTOR | - mechanistic target of rapamycin |
| NFAT | - nukleær faktor for aktive T-celler |
| NF κ B | - nukleær faktor κ B |
| PHA | - phytohemagglutinin |
| PMA | - phorbol 12-myristate 13-acetate |
| PBMC | - peripheral blood mononuclear cells (mononukleære celler i perifert blod) |
| PBS | - phosphate buffered saline / fosfatbufret saltvann |
| PD | - farmakodynamikk |
| PG | - farmakogenetikk |
| P-gp | - P-glykoprotein |
| PK | - farmakokinetikk |
| RNA | - ribonukleinsyre |
| SNP | - single nucleotide polymorphism / enkelt nukleotid-polymorfisme |
| TCR | - T-celle reseptor |
| TDM | - therapeutic drug monitoring (terapeutisk legemiddelmonitorering) |
| T _{max} | - tid før maksimum konsentrasjon (C _{max}) oppnås etter en dose |
| TNF α | - tumor nekrose faktor- α |
| T _{reg} | - regulatoriske T-celler |
| TRIS-HCl | - tris-hydroklorid |
| Tx | - transplantasjon |
| WST-1 | - celleproliferasjonsreagenset (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) |

Sammendrag

Immundempende legemidler som brukes for å hindre avstøtning av transplanterte organer, har en høy grad av farmakokinetisk variabilitet innen og mellom pasientene. Dosene justeres i dag ofte ut ifra blodkonsentrasjonsmålinger. Det er sannsynlig at det også er en høy grad av farmakodynamisk variabilitet mellom pasientene. Derfor er det mulig at den immundempende behandlingen ytterligere kan individualiseres ved hjelp av cellulære eller molekulære responsmålinger (farmakodynamiske målinger).

Formålet med dette delprosjektet var å utvikle metoder som kan brukes til kvantifisering av immuncellers aktiveringskapasitet. Utvalgte *ex vivo* aktiveringssprinsipper skulle testes ut i ulike cellematerialer fra blodprøver. Molekyler som kan reflektere cellers energistatus og metabolske aktivitet, skulle undersøkes som potensielle markører. Videre skulle det undersøkes om slike målinger egnet seg til å gradere aktiveringskapasiteten når de aktiverte immuncellene ble eksponert for immundempende legemidler. Det langsiktige målet med prosjektet er å undersøke om lymfocyttenes aktiveringskapasitet kan fungere som markør på cellulær immunstatus og effekt av immundempende behandling hos transplanterte pasienter.

Det ble først forsøkt å aktivere isolerte mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) ved hjelp av phytohemagglutinin (PHA), for deretter å kvantifisere cellenes nivå av adenosin 5'-trifosfat (ATP). Det ble forsøkt å aktivere T-celler i fortynnet fullblod ved hjelp av PHA og via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene, før etterfølgende isolering av CD4⁺ celler og kvantifisering av ATP. Deretter ble det forsøkt å aktivere isolerte CD4⁺ celler via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene. Ved sistnevnte aktiveringsprinsipp ble ATP, mitokondriell dehydrogenase-aktivitet (formazan-farge dannet fra WST-1), purinbaser og IMPDH-aktivitet undersøkt som markører.

Aktivering av isolerte CD4⁺ celler via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene og etterfølgende kvantifisering av metabolsk aktivitet ved hjelp av WST-1, viste seg å være den metoden med høyest målepresisjon og størst forskjell mellom nivået i aktiverte og ikke-aktiverte celler. Mitokondriell dehydrogenaseaktivitet i *ex vivo* aktiverte T-celler (målt ved WST-1) vil kunne være en god legemiddeluspesifikk farmakodynamisk markør for alle de immundempende

legemidlene, siden markøren gjenspeiler cellenes sensitivitet uavhengig av legemidlenes virkemekanisme.

Det ble undersøkt om aktivering av isolerte CD4⁺ celler via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene og etterfølgende kvantifisering av metabolsk aktivitet (WST-1) egnet seg til å gradere aktiveringskapasiteten når de aktiverte immuncellene ble eksponert for de ulike immundempende legemidlene. Resultatene indikerte at dette prinsippet for sensitivitetstesting kan være mulig å få til i praksis, men det er for tidlig å fastslå om metoden kan brukes til å beskrive farmakodynamikken hos transplanterte pasienter.

Videre må presisjonen på responskurvemålingene forbedres, det må undersøkes om måleresultatene korrelerer med klinisk utfall i pasientpopulasjoner, og man må eventuelt dokumentere den kliniske nytteverdien av et slikt farmakodynamisk monitoreringsprinsipp. Farmakodynamiske målinger i forkant av transplantasjonen kan, i tillegg til blodkonsentrasjonsmålinger etter transplantasjon, gi nyttig informasjon om den enkelte pasients legemiddeleffekt og dermed bidra til en optimal og individualisert immundempende behandling.

1. Innledning

1.1 Organtransplantasjon

Med transplantasjon menes overføring av celler, vev eller organer fra et individ til et annet. Begrepet innbefatter også ”flytting” av vev innen et individ. Transplantasjoner er i dag en viktig behandlingsform for noen kreftformer, hematologiske sykdommer og en rekke typer organsvikt (1).

Den medisinske profesjonen hadde over lengre tid et håp om å kunne erstatte syke, skadede og funksjonsnedsatte organer og vev. Tre grunnleggende problemer måtte løses for å muliggjøre dette: Først måtte transplantatene kunne introduseres på måter slik at de kunne utøve sine normale funksjoner. Deretter måtte helsen og funksjonen til både mottaker av transplantatet og transplantatet opprettholdes under transplantasjonsprosedyrer og operasjon. For det tredje måtte det forebygges at mottageren utviklet ugunstige immunresponser som kunne resultere i avstøtning av transplantatet, destruksjon av friskt vev og andre komplikasjoner (2).

I 1954 ble den første vellykkede kliniske nyretransplantasjonen utført, mellom to eneggede tvillinger i Boston. Det var ikke uventet at transplantasjonen var vellykket siden de to var genetisk identiske (en syngen transplantasjon), og dermed var immunsupprimerende behandling unødvendig. Allerede i 1956 ble Nordens første transplantasjon med en nyre fra en ubeslektet giver (en allogen transplantasjon mellom genetisk ulike individer) utført av Leif Efskind ved Rikshospitalet i Oslo. I tillegg til at donornyren var allogen, var den også AB0-blodtypeuforlikelig. Pasienten levde i 30 dager, selv om det bare ble brukt helkroppsbestråling og kortison som immunsuppresjon for å forhindre avstøtning (3).

De nordiske landene opprettet i 1968 samarbeidsorganisasjonen Scandiatransplant, først og fremst for å ha en felles venteliste for pasienter som venter på en nyre fra en avdød giver. Dette skulle sikre at mottakeren fikk en nyre med best mulig vevsforlikelighet. Ventelisten omfatter i dag også andre organer (4,5)

1.2 Immunrespons

1.2.1 Vevsforlikelighet

Immunresponser mot transplanterte vev og organer forårsakes av genetiske forskjeller mellom donor og mottaker. Forskjeller i de høyt polymorfe HLA klasse I og klasse II-molekylene spiller da en betydelig rolle. Genkomplekset som koder for disse overflatemolekylene, har det generelle navnet *the major histocompatibility complex* (MHC) og går under ulike navn for ulike arter. Det humane MHC kalles *the human leukocyte antigen complex*, HLA-komplekset. Oppgaven til HLA-molekylene er å presentere fragmenter fra mikroorganismer o.l. for immunceller, slik at en eventuell immunrespons kan igangsettes.

Antigener som varierer mellom medlemmer av samme art, kalles alloantigener. Selv om T-celler hovedsakelig reagerer på fremmede antigener presentert på egne HLA-molekyler, er det en høy frekvens av T-celler som reagerer på fremmede HLA-molekyler. Dette kalles alloreaktivitet. En transplantasjon gjort mellom genetisk ulike individer innen samme art er derfor en allogen transplantasjon (1,2)

Ved klinisk transplantasjon kan to typer alloreaksjoner oppstå, avhengig av hvilket vev som transplanteres. Etter transplantasjon av organer som nyre og lever, utvikler mottakerens immunsystem en alloreaksjon rettet mot transplantatets celler. Prosessen kan føre til avstøtning av transplantatet. En annen type alloreaksjon oppstår i forbindelse med beinmargstransplantasjon hvor donorens modne T-lymfocytter i den transplanterte beinmargen angriper og avstøter mottakerens friske vev, en såkalt *graft-versus-host* reaksjon.

Genetisk nedarvede AB0-antigener uttrykkes på endotelceller i blodårene og disse er en viktig faktor innen transplantasjon av organer. Hvis en mottaker med blodtype 0 mottar en nyre fra en donor med blodtype A, vil anti-A-antistoffer i mottakerens sirkulasjon raskt bindes til blodårene i transplantatet. Antistoffene vil binde til komplement-komponenter i blodårene i transplantatet, og en alvorlig og rask avstøtning vil skje. Siden HLA klasse I-molekyler uttrykkes vesentlig i vaskulært endotel, kan preformerte antistoffer mot HLA klasse I polymorfismer også forårsake en slik hyperakutt avstøtning. Røde blodceller uttrykker derimot ikke HLA (2).

1.2.2 Immunceller og deres funksjon

Cellene som utgjør immunsystemet består av hvite blodceller, leukocytter, og vevscellene som er tilknyttet dem. Leukocytterne stammer fra en felles hematopoietisk stamcelletype, som deler seg og differensierer til mer spesialiserte stamceller. Disse gir opphav til blant annet den lymfoide og den myeloide cellelinjen, som begge resulterer i immunceller.

En gruppe celler fra den myeloide cellelinjen består av granulocytter som har utpregede cytoplasmiske granuler inneholdende reaktive substanser som dreper mikroorganismer og fremmer inflammasjon. Den andre gruppen består av monocytter, makrofager og dendritiske celler. Monocytter er mobile og sirkulerende forløpere til vevsbundne makrofager. Makrofager er langtidslevende ryddeceller som fagocytterer døde celler, cellerester og invaderende mikroorganismer. Makrofager organiserer den lokale infeksjonsresponsen gjennom å skille ut cytokiner og andre biologisk aktive molekyler som rekrutterer andre leukocytter til infeksjonsområdet. Dendritiske celler er profesjonelle antigenpresenterende celler (APC). De fungerer som cellulære budbringere som transporterer patogener, peptider og andre antigener til de lymfoide organene. Her presenteres de fremmede strukturene for sirkulerende lymfocytter, som videre kan aktiveres og ekspandere i antall. Den ervervede immunresponsen består dermed av antigenspesifikk B- og T-lymfocyttespons mot et antigen, inkludert utvikling av immunologisk hukommelse.

T-lymfocytter, B-lymfocytter og *Natural Killer* (NK)-celler utgjør cellene i den lymfoide cellelinjen. B-celler og T-celler gjenkjenner antigener ved hjelp av sine celleoverflatemolekyler, henholdsvis B-celle-reseptorer og T-celle-reseptorer (TCR). B-celle reseptorene kalles immunoglobuliner. Når denne reseptoren binder et antigen, stimuleres B-cellen til proliferasjon og differensiering til plasmaceller. Disse resulterende effektor B-cellene skiller ut antistoffer, som er løselige former av immunoglobulinene. T-celle-reseptorer (TCR) uttrykkes utelukkende som gjenkjennelsesreseptorer på celleoverflaten, og ikke som løselige proteiner. Et antigen er en struktur som gjenkjennes og bindes av et immunoglobulin eller TCR. Slike strukturer kan komme fra molekyler, makromolekyler, viruspartikler eller celler.

T-lymfocytter deles inn i T-celler som uttrykker koreseptoren CD8 og T-celler som uttrykker koreseptoren CD4. Koreseptorene er celleoverflateproteiner som øker en antigenreseptors sensitivitet til dets antigen gjennom økt intracellulær signalering. CD8 koreseptoren binder til

HLA klasse I-molekyler og CD4 koreseptoren binder til HLA klasse II-molekyler på den antigenpresenterende cellen, og slik forsterkes dermed T-cellenes antigenrespons. CD8⁺ T-celler er cytotoksiske og deres hovedfunksjon er å drepe celler som er infisert med virus eller andre intracellulære patogener. CD4⁺ T-celler, såkalte hjelper-T-celler, hjelper andre celler i immunsystemet til å respondere på ekstracellulære infeksjonskilder ved å danne en rekke cytokiner. Blant disse er interleukin-2 som er en vekstfaktor for T-celler og interferon- γ som aktiverer monocytter. De utskilte cytokinene gjør at CD4⁺ T-celler er involvert i stimuleringen av B-celler til å danne antistoffer som igjen binder seg til ekstracellulære patogener og viruspartikler. I tillegg aktiverer CD4⁺ T-celler vevsbundne makrofager slik at de skiller ut cytokiner og fagocyterer og dreper ekstracellulære patogener. En annen undergruppe av CD4⁺ T-celler er regulatoriske T-celler (T_{reg}). Disse holder aktiviteten av andre effektor T-celler under kontroll og forebygger derved autoimmunitet.

I motsetning til B-og T-lymfocytter som er en del av det ervervede immunsystemet, er NK-celler en del av det medfødte immunsystemet. De er granulære, cytotoksiske lymfocytter som sirkulerer i blodet, og de er viktige i forsvaret mot intracellulære infeksjoner som virusinfeksjoner.

CD4 uttrykkes på overflaten av T hjelperceller, regulatoriske T-celler, monocytter, makrofager og dendrittiske celler. CD8 uttrykkes hovedsakelig på cytotoksiske T-celler, men kan også uttrykkes på NK-celler og dendrittiske celler. HLA klasse I-molekyler presenterer antigener av intracellulær opprinnelse til CD8⁺ T-celler, mens HLA klasse II-molekyler presenterer antigener av ekstracellulær opprinnelse til CD4⁺ T-celler (2).

1.2.3 Aktiveringsmekanismer

T-celle-reseptorenes funksjon er å gjenkjenne og binde antigen, mens immunoglobulinene både gjenkjenner og binder antigen samt utfører effektorfunksjoner. T-celle-reseptorene er produsert som et resultat av rearrangering av gener, og de er høyst variable i deres antigenspesifisitet. Hver klon av T-celler uttrykker en enkelt type antigenreseptor, og derfor innehar de ulike klonene ulike og unike antigenspesifisiteter.

På celleoverflaten eksisterer T-celle-reseptoren i et stabilt kompleks med CD3-proteiner og ζ -kjeder. Disse utgjør sammen det funksjonelle T-celle-reseptorkomplekset (TCR-komplekset) hvor TCR står for antigengjenkjenningen og CD3-proteinene og ζ -kjedene står for den påfølgende signaloverføringen inn i cellen. Det intracellulære signalet som genereres fra TCR-komplekset når et antigen gjenkjennes, er nødvendig for å aktivere en naiv T-celle, men det er ikke tilstrekkelig i seg selv. Det kreves i tillegg et kostimulatorisk signal inn i cellen. Kostimulatoriske signaler leveres bare av profesjonelle antigenpresenterende celler som dendritiske celler, makrofager og B-celler. For aktivering må stimuleringen via TCR-komplekset og kostimuleringen leveres av ligander på den samme antigenpresenterende cellen. Kostimulatorisk reseptor på de naive T-cellene, CD28, mottar det kostimulatoriske signalet fra B7 molekyler, som er kostimulatoriske molekyler på de antigenpresenterende cellene.

I synapsen som oppstår mellom T-cellen og den antigenpresenterende cellen, grupperer antigen:HLA-komplekset, TCR-komplekset og koreseptoren seg sammen, med celleadhesjonsmolekyler tett rundt. Signalet om at antigenet er bundet til TCR overføres til det indre av cellen ved hjelp av CD3-proteinenes cytoplasmiske haler som inneholder sekvenser kalt ITAM. Disse interagerer med cytoplasmiske reseptor-assosierte tyrosinkinaser som fosforylerer CD3-proteiner, ζ -kjeder og tyrosinresiduer i ITAM-sekvensene.

Signalene fra TCR og signaler fra CD4- eller CD8-koreseptor kombineres for å stimulere T-cellen. Den cytoplasmiske tyrosinkinasen ZAP-70 binder seg til fosforylerte ITAM-sekvenser i ζ -kjeden, men dette skjer ikke før koreseptoren bindes til HLA-molekylet på den antigenpresenterende cellen. Dette bringer kinasen Lck inn som en del av komplekset, som da fosforylerer og aktiverer ZAP-70. Den T-celle-spesifikke kinasen ZAP-70 er essensiell for initieringen og triggering av tre intracellulære signalveier hos aktiverte T-celler.

I naive T-celler fører disse tre signalveiene til endret genuttrykk, produsert av transkripsjonsaktivatoren NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) i kombinasjon med andre transkripsjonsfaktorer. En signalvei går via den sekundære budbringeren inositol trisfosfat og medfører aktivering av fosfatasen kalsineurin som videre aktiverer NFAT. En annen signalvei leder til aktivering av protein kinase C- θ , noe som resulterer i induksjon av transkripsjonsfaktoren NF κ B. Den tredje signalveien involverer aktivering av det GTP-bindende proteinet Ras, og leder til aktivering av kjerneproteinet Fos som er en komponent av transkripsjonsfaktoren AP-1. De kombinerte funksjonene av NFAT, AP-1 og NF κ B skruer på

transkripsjonen av gener som fører til T-celle proliferasjon og utvikling av effektorfunksjoner. Genet som koder for cytokinet interleukin-2 (IL-2) er et av de viktigste.

IL-2 syntetiseres og sekreses av den aktiverte T-cellen. Produksjonen av IL-2 krever både signalet via TCR:koreseptor-komplekset og det kostimulatoriske signalet via CD28. Signalene via TCR:koreseptor-komplekset aktiverer NFAT som igjen aktiverer transkripsjon av IL-2-genet. Det kostimulatoriske signalet fra CD28 stabiliserer IL-2 mRNA, noe som fører til en 20-30 ganger økt IL-2 produksjon i T-cellen. I tillegg fører det kostimulatoriske signalet via CD28 til en ytterligere økning i transkripsjon av IL-2 genet. Ved aktivering begynner den naive T-cellen å danne høyaffinitets IL-2-reseptorer. Sekret IL-2 binder til disse og det resulterende intracellulære signalet stimulerer den klonale ekspansjonen av den aktiverte cellen. Dette gir et stort antall antigenspesifikke effektorceller. De CD4⁺ T-cellene differensierer til cellerpopulasjoner med ulike funksjoner: T-hjelperceller som T_H1 og T_H2, samt T_{reg}-celler (2).

1.2.4 Immunologiske prinsipper for avstøtning

Avstøtningsreaksjoner deles inn i hyperakutt, akutt og kronisk avstøtningsreaksjon basert på tidspunktet for avstøtningen og hvilke immunologiske mekanismer som dominerer avstøtningsreaksjonen. Man kan redusere forekomst og grad av avstøtningsreaksjoner ved adekvat immunsuppressiv behandling, AB0-forlikelighet og best mulig HLA-forlikelighet mellom donor og mottaker (6).

Før transplantasjon har noen mottakere allerede dannet antistoffer som vil reagere med donor AB0- eller HLA klasse I-antigener. Etter transplantasjon vil antistoffene da straks binde seg til disse antigenene på vaskulært endotel og initiere komplementsystemet og koagulasjonskaskaden. Blodårer i transplantatet obstrueres og lekker, noe som forårsaker blødninger i transplantatet. Organet forstørres, blir lillafarget på grunn av oksygenfattig blod, og dør. Dette er en hyperakutt avstøtning og kan skje selv før pasienten har forlatt operasjonsbordet. Tidligere ble donorer og mottakere blir AB0-typet og kryss-sjekket for AB0-antigenene før transplantasjonen, for å unngå en hyperakutt avstøtning av transplantatet. I dag transplanterer man av og til på tvers av blodgruppene.

De fleste organtransplantasjoner utføres med noen HLA klasse I og/eller II-ulikheter mellom donor og mottaker. Mottakerens T-cellepopulasjon inkluderer da kloner av alloreaktive T-celler som gjenkjenner de av det transplanterte vevets HLA-typer som ikke er lik mottakerens. CD8⁺ T-celler responderer på HLA klasse I-ulikhetene og de CD4⁺ T-cellene responderer på HLA klasse II-ulikhetene. Den alloreaktive T-celle-responsen produserer CD4⁺ og CD8⁺ effektorceller som begge kan angripe og ødelegge transplantatet. Dette kan føre til en akutt avstøtningsepisode som kan utvikles etter noen dager eller lengre tid. Slike akutte avstøtninger kan forebygges og behandles ved hjelp av immundempende legemidler (2).

I de sekundære lymfoide organene kan T-celler aktiveres ved direkte eller ved indirekte alloaktivering. Etter en organtransplantasjon vandrer donors antigenpresenterende dendrittske celler, som på celleoverflaten bærer komplekser av donors HLA-molekyler og peptider, fra transplantatet og til mottakerens sekundære lymfoide organer som milt og lymfeknuter. Enkelte av mottakerens T-lymfocytter har reseptorer som spesifikt kan binde kompleksene av allogene donor HLA (klasse I og II) og donorpeptider. Dette er en direkte alloaktivering.

Ved en indirekte alloaktivering vil membranfragmenter som inneholder HLA-molekyler fra donor-deriverte dendrittske celler som har gjennomgått apoptose, endocytteres og prosesseres av mottakerens dendrittske celler. Disse antigenpresenterende cellene presenterer alloantigenene ved hjelp av sine HLA klasse II-molekyler til mottakerens egne CD4⁺ T-celler.

Aktiverte alloreaktive effektor T-celler migrerer så til transplantatet, hvor T_H1-celler aktiverer makrofager til å inflammere vevet ytterligere, og cytotoksiske CD8⁺ T-celler går til angrep og dreper celler i transplantatet.

Kroniske avstøtningsreaksjoner kan skje måneder eller år etter transplantasjonen. Denne avstøtningstypen er korrelert med antistoffer som er spesifikke for HLA klasse I-molekyler i transplantatet. Reaksjoner i blodårene i transplantatet karakteriseres av at blodåreveggene fortykner slik at blodårenes indre diameter innsnevres. Blodtilførselen blir etter hvert utilstrekkelig, og transplantatet kan dø på grunn av iskemi og tap av funksjon (2,6).

1.3 Immundempende legemidler

1.3.1 Farmakoterapi, farmakokinetikk og farmakodynamikk

Immundempende legemidler undertrykker alloreaksjoner som ellers ville føre til avstøtning av transplantatet. En vellykket alloge transplantasjon er mulig ved å bruke kombinasjoner av immundempende legemidler: legemidler som hemmer signalveier for T-celleaktivering, cytotoksiske legemidler som interfererer med DNA-syntese og anti-inflammatoriske kortikosteroider.

Ciklosporin A, takrolimus, everolimus og sirolimus er legemidler som selektivt hemmer signalveier for T-celle aktivering. Da disse legemidlene ble innført på 1980- og 1990-tallet, medførte det økt transplantatoverlevelse. Dermed kunne flere typer vev og organer transplanteres og transplantasjon ble behandlingsform for flere sykdommer. Ciklosporin hemmer antigen-aktiveringen av T-celler ved å hindre overføringen av signaler fra T-celle reseptoren. I cytosol binder ciklosporin til ciklofilin, og dette komplekset hemmer kalsineurins fosfatase-aktivitet slik at aktiveringen av NFAT hindres. Dette hemmer produksjonen av IL-2, og T-celle-aktivering, proliferasjon og differensiering avbrytes på et veldig tidlig stadium. Takrolimus supprimerer T-celle-aktivering ved å binde seg til FK-bindende protein i cytosol og hemme kalsineurin gjennom en lignende mekanisme, tross strukturell ulikhet fra ciklosporin (se figur 1). Selv om hovedeffekten av disse kalsineurinhemmerene (CNI) er hemming av T-celle aktiveringen, blir også aktiveringen av B-celler og granulocytter nedsatt. En stor fordel med disse legemidlene er at de i mindre grad påvirker andre aktivt prolifererende celler, slik at man ikke får den reduserte hematopoiesen og intestinale skader som sees med de cytotoksiske legemidlene. Nefrotoksisitet er en vanlig bivirkning ved kontinuerlig bruk av ciklosporin og takrolimus, og noen pasienter vil ikke lenger tolerere legemidlet (2,7).

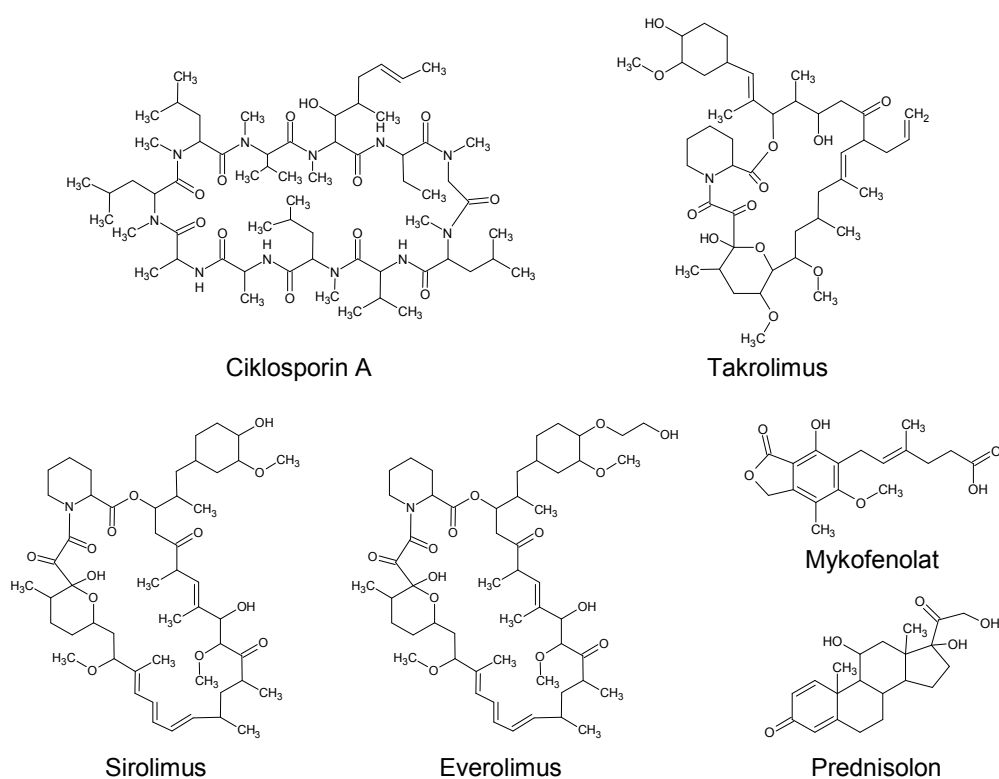
Suksessen med ciklosporin og takrolimus innen transplantasjon ga inspirasjon til å finne tilsvarende selektive legemidler. Sirolimus ble først oppdaget som et bakterielt produkt i en jordprøve på Påskeøya, og strukturanalogen everolimus ble senere syntetisert. Sirolimus og everolimus interfererer ikke med kalsineurin, men stanser T-celle-aktiveringen i et senere trinn ved å hindre signaloverføring fra IL-2 reseptoren ved å blokkere *mechanistic target of*

rapamycin (mTOR), en proteinkinase som er essensiell for cellesyklusprogresjonen. Både IL-2 reseptor-avhengige og CD28-avhengige signalveier hemmes av disse effektene på mTOR. Disse mTOR-hemmerne er mer toksiske enn ciklosporin og takrolimus, men har blitt nyttige komponenter i kombinasjonsterapi med andre immundempende legemidler (2,7-9). Bruk av mTOR-hemmere bør spesielt vurderes i tilfeller der pasienter har hatt kreft eller utvikler det etter en tids bruk av immundempende legemidler (8). De kan i tillegg være et alternativ for å bedre langtids nyrefunksjon, siden de er mindre nefrotoksiske enn kalsineurinhemmere (10). De vanligste bivirkningene av sirolimus er hyperlipidemi, trombocytopeni, leukopeni og anemi (9).

Cytotoksiske legemidler hemmer proliferasjonen av aktiverte lymfocytter, samtidig som de vil kunne skade andre vev i kroppen som har en aktiv proliferasjon. Affiserte vev er hovedsakelig beinmarg, tarmepitel og hårfollikler. Det cytotoksiske legemidlet som er mest utbredt innen transplantasjon i dag er enzymhemmeren mykofenolat. Dette legemidlet finnes som mykofenolatmofetil (prodrug) og enterodrasjert mykofenolatsodium. Mykofenolat hemmer selektivt og reversibelt inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH). IMPDH er et enzym som er nødvendig i *de novo* syntesen av guanin-nukleotider. Den nedsatte IMPDH-aktiviteten reduserer cellenes kapasitet for RNA- og DNA-syntese, og dermed bremses B- og T-cellenes proliferasjon. Disse cellene er i høy grad avhengige av *de novo* syntese av puriner for å kunne gjennomgå celledeling, mens andre celler i større grad kan bruke alternative synteseveier og resirkulering av puriner. Andre konsekvenser av IMPDH-hemmingen er undertrykkelse av B-cellenes antistoffproduksjon, redusert uttrykksgrad av adhesjonsmolekyler og dermed hemming av lymfocyt og monocyt-rekruttering, og nedsatt modning av dendritiske celler. Mykofenolat administreres kun etter transplantasjonen, ikke før, siden legemidlet ikke kan utøve effekt før en pasients immunsystem er aktivert med alloantigen. (2,11,12).

Prednisolon og metylprednisolon er syntetiske steroider med om lag fem ganger sterkere anti-inflammatoriske egenskaper enn kortisol som naturlig dannes i binyrebarken. Disse glukokortikoidene har et vidt spekter av fysiologiske effekter og affekterer ikke bare lymfocytter, men alle leukocytter, samt andre celler i kroppen. Ulikt mange andre biologisk aktive molekyler virker ikke steroidhormonene via celleoverflate-reseptorer, men diffunderer over plasmamembranen og binder til spesifikke reseptorer i cytoplasma. Komplekset av reseptor og steroid går inn i cellekjernen hvor det binder selektivt til spesifikke gener og regulerer deres transkripsjon. Glukokortikoider utøver en viktig antiinflammatorisk effekt ved å hemme effekter av NF- κ B, som er en viktig transkripsjonsfaktor for cellulær aktivering og

produksjon av cytokiner (blant annet IL-2) i immunresponsen. En annen effekt av steroidene er oppsamling av lymfocytter i beinmargen, og de ender dermed ikke i sekundære lymfoide vev og inflammerte områder. Dette forebygger alloantigen-stimulering av lymfocytter, samt forebygger at effektor T-celler går inn i og angriper transplantatet. Glukokortikoider er mest effektive som immundempende legemidler når behandlingen initieres før transplantasjonen. Da vil cytokinenes genekspresjon allerede være endret i mottakerens celler ved eksponeringen overfor alloantigen i forbindelse med transplantasjonen. Ved avstøtningsepisoder brukes høydose glukokortikoider som akutt immunsuppresjon. Glukokortikoider har mange bivirkninger inkludert væskeretensjon, vektøkning, diabetes mellitus, nedsatt bentetthet og tynnere hud (2). Med økt dose og varighet av glukokortikoidbehandling følger en økt risiko for infeksjoner. Bivirkninger er hyppigere ved langtidsbehandling enn ved korttidsbehandling, selv når høye doser inngår i korttidsbehandlingen. Derfor er det vanlig å redusere vedlikeholdsdosen gradvis til et minimum i tiden etter transplantasjon (13).



Figur 1. Molekylstrukturer for de immundempende legemidlene ciklosporin A, takrolimus, mykofenolat, sirolimus, everolimus og prednisolon.

I tillegg til de tre hovedtypene immundempende legemidler, brukes antistoffer som er spesifikke overfor T-celler. Basiliximab er et monoklonalt immunoglobulin som gis i forbindelse med nyretransplantasjonen for å forebygge akutt avstøtning. Antistoffet binder spesifikt til aktiverte T-lymfocytters IL-2 reseptor og inaktiverer denne, slik at T-celleproliferasjonen hemmes (2,7,8)

Immundempende legemidler brukes generelt i kombinasjoner for å oppnå additive immundempende effekter, mens de toksiske effektene minimeres (2). Av levertransplanterte som behandles med duobehandling (steroider og CNI) utvikler 20 % nyresvikt over tid (14). Trippelbehandling med steroider, lavdose CNI (ciklosporin eller takrolimus) og mykofenolat antas å redusere nyrekomplikasjonene. Som induksjons- og vedlikeholdsbehandling gis rutinemessig trippelbehandling med steroider, takrolimus og mykofenolat, alternativt brukes trippelbehandling med steroider, ciklosporin og mykofenolat (14). Standard induksjons- og vedlikeholdsbehandling ved nyretransplantasjon består av en kvadrupel behandling med IL-2-reseptor-antistoff ved operasjonen og etter fire dager, steroider, CNI (ciklosporin eller takrolimus) og mykofenolat (hvor dosen av mykofenolat er avhengig av CNI-type) (8).

Den genetiske variasjonen innen de genene som er involvert i et legemiddels distribusjon, metabolisme, eliminasjon og farmakologiske mål, kan delvis være grunnen til den høye farmakokinetiske og farmakodynamiske variabiliteten av immundempende legemidler mellom transplantasjonspasienter. Farmakogenetikk (PG) innebærer å se på korrelasjonen mellom genuttrykk eller enkeltnukleotid-polymorfismer (SNP) og legemiddeleffekt og -toksisitet. Mange retrospektive studier har vist en klar sammenheng mellom enkeltnukleotid-polymorfismen CYP 3A5*1/*3 og farmakokinetikken for takrolimus, mens det fortsatt stilles spørsmål angående påvirkningen av CYP3A5*1/*3 og CYP3A4*/*1B på eksponeringen av ciklosporin og sirolimus. Innen behandlingen med immundempende legemidler bidrar CYP 3A polymorfismer til klinisk variabilitet av metabolismerelaterte legemiddelinteraksjoner (15). En del legemidler kan hemme eller indusere CYP3A4 og P-gp. Derfor er det et stort potensial for legemiddelinteraksjoner ved bruk av både kalsineurinhemmerne og mTOR-hemmerne siden begge gruppene er substrater for CYP3A4 og P-glykoprotein (P-gp) (16). Flere prospektive randomiserte studier i store populasjoner er nødvendig for videre å kartlegge de genetiske effektene av CYP3A på eksponering og respons av immundempende legemidler (15).

1.3.2 Terapeutisk legemiddelmonitorering

Det foretas i dag rutinemessig blodkonsentrasjonsmålinger av mange av de immundempende legemidlene, særlig siden mange av disse har et smalt terapeutisk vindu. Dette går under begrepet *therapeutic drug monitoring* (TDM). Individuelt tilpassede doser av disse legemidlene er påkrevd for å forebygge overmedisinering som kan gjøre pasienten mottagelig for infeksjon og toksiske effekter, eller undermedisinering som kan føre til kortere overlevelse av transplantatet som følge av avstøtningsepisoder. På grunn av farmakokinetiske ulikheter mellom individer korrelerer ikke mengden av legemiddel målt i blodet direkte med administrert dose. Farmakodynamiske variasjoner vil også kunne bidra til variabel og dermed mer uforutsigbar respons. Formålet med blodkonsentrasjonsmålingene er å sikre terapeutiske legemiddelnivåer, forebygge toksiske nivåer, samt å monitorere pasientenes compliance (17).

Farmakokinetisk monitorering

Farmakokinetikk (PK) kan defineres som kvantifisering av tidsforløpet av, og hvor et legemiddel og dets metabolitter er i kroppen, og utviklingen av passende modeller for å beskrive dette. PK innbefatter hva kroppen gjør med legemidlet gjennom absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon (18). Farmakokinetisk monitorering av plasmakonsentrasjoner av immundempende legemidler hos hver enkelt pasient kan være til hjelp for å estimere klinisk effekt og predikere forekomst av bivirkninger og toksisitet (19).

Kalsineurinhemmerne ciklosporin og takrolimus har smale terapeutiske vinduer og høy intra- og interindividuell farmakokinetisk variabilitet. For ciklosporin er predose (C_0) monitorering fortsatt mest utbredt, selv om det er kjent at denne farmakokinetiske parameteren kun i moderat grad reflekterer AUC_{0-12h} . Innen nyretransplantasjon har den forkortede AUC_{0-4h} en veldig forbedret korrelasjon med AUC_{0-12h} i forhold til C_0 . Men siden multippel prøvetaking er upraktisk, har konsentrasjonen ved 2 timers tidspunktet (C_2) utviklet seg til en passende surrogatmarkør for ciklosporineksponering og til et verktøy for å detektere overeksponering. Fra studieresultater anbefales en kombinasjon av C_0 og C_2 monitorering. C_0 er den beste indikatoren på compliance, siden et C_2 -nivå tatt på sykehuset ikke nødvendigvis varsler klinikerne om hvorvidt en pasient tar medisinene sine regelmessig hjemme. For takrolimus er det derimot en god korrelasjon mellom C_0 og AUC_{0-12h} (16).

mTOR-hemmerne everolimus og sirolimus har også et smalt terapeutisk vindu og høy intra- og interindividuell farmakokinetisk variabilitet. For disse legemidlene er det en god korrelasjon mellom C_0 og AUC_{0-12h} . C_0 er dermed en god surrogatmarkør for everolimus og sirolimus eksponering (16).

Det er for mykofenolat funnet en signifikant korrelasjon mellom AUC_{0-12h} og akutt avstøtning. For C_0 er det funnet en svakere korrelasjon. Selv om AUC er en bedre prediktor enn C_0 , er det C_0 som oftest benyttes i klinisk praksis (16). Monitorering av mykofenolat er mindre strengt definert i behandlingsprotokoller siden det originalt var et fast-dose regime av mykofenolat som var godkjent for forebygging av akutt avstøtning (20). Ved Rikshospitalet brukes C_0 -målinger av mykofenolat som et veiledende hjelpemiddel i behandlingen.

Farmakodynamisk monitorering

Ved farmakodynamisk monitorering av et legemiddel kvantifiseres den biologiske responsen av legemidlet, altså hva legemidlet gjør med kroppen (18).

For å forbedre dagens immundempende behandling er det behov for metoder som kan bestemme og vurdere pasienters immunstatus før transplantasjon. Dette kan gi informasjon som gjør det mulig å individualisere immundempende behandling, predikere immunologisk skade på transplantatet og minimere toksisitet. Det ultimate vil være å gi en individtilpasset dose av riktig legemiddel til hver enkelt pasient fra begynnelsen av behandlingen. For å evaluere det terapeutiske potensialet hos hver enkelt pasient før administrering av de immundempende legemidlene, kan en farmakodynamisk tilnærming være en effektiv strategi. Et eksempel er bruk av mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) isolert fra hver pasient, i *ex vivo* tester, som kan gi prediktiv informasjon om individuell sensitivitet overfor ulike immundempende legemidler (19). Kurata et al. beskriver metoder for cellulær immunmonitorering som bestemmer T-celle sensitivitet overfor ulike legemidler i fremtidige nyretransplanterte (20). Slik cellulær farmakodynamikk av immundempende legemidler kan bli en attraktiv måte å peke ut resistente pasienter i forkant av transplantasjon og oppstart med medikamentell behandling. Mange pasienter mottar i dag immundempende behandling til tross for alvorlige bivirkninger og dårlig immundempende respons (21).

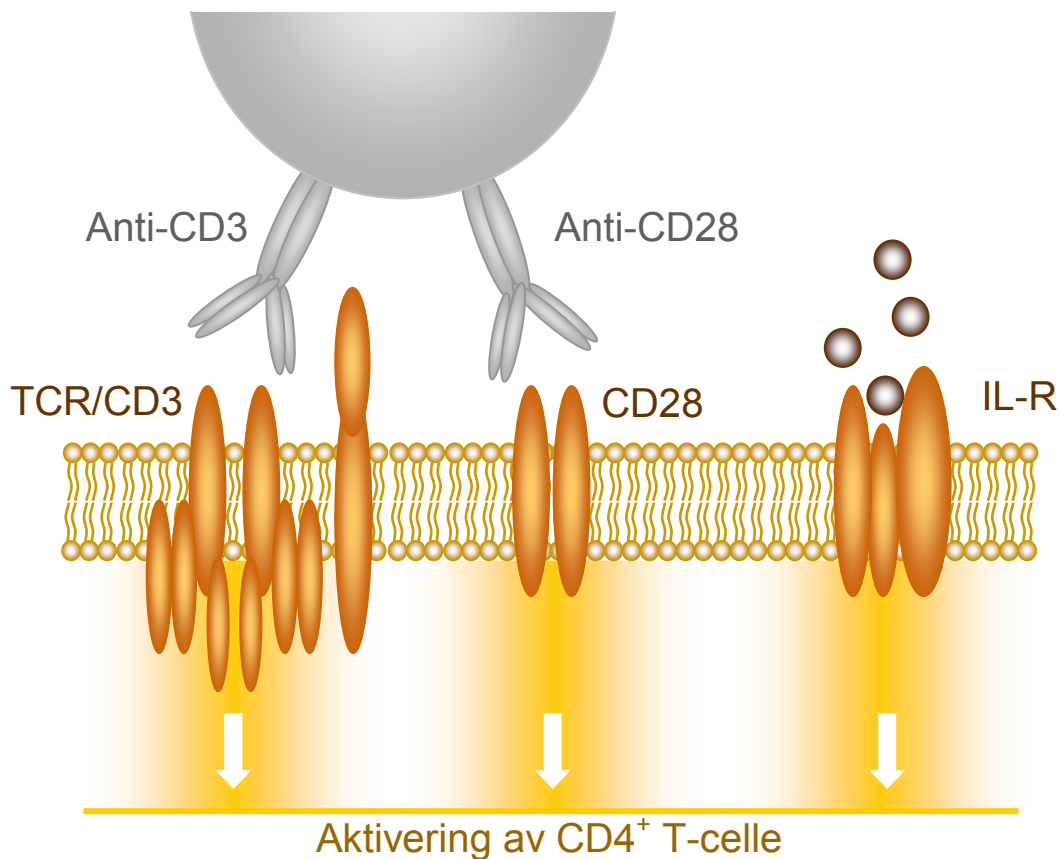
Selv om flere metoder for måling av T-celle proliferasjon, cytokiner og celleoverflatemarkører er rapportert, er det ingen som brukes rutinemessig klinisk. Dette har til dels en sammenheng

med at metodene er teknisk komplekse og ressurskrevende (20). En metode for immunmonitorering (ImmuKnow; Cylex, Columbia, MD) er blitt teknisk godkjent av U.S Food and Drug Administration. Metoden måler den tidlige responsen på *ex vivo* immunaktivering ved deteksjon av den intracellulære ATP syntesen i CD4+ celler. Analysemetoden er under uttesting for monitorering av immunstatus i immunsupprimerte populasjoner (22). Fremtidig uttesting av potensielle metoder for immunmonitorering vil være nødvendig for å dokumentere en eventuell klinisk gevinst.

1.4 Prinsipper for ex vivo aktivering av immunceller

1.4.1 Aktivering via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene

Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 er et produkt som tilnærmer fysiologisk aktivering av humane T-celler som CD4+ celler, CD8+ celler, polyklonale T-celler eller antigenspesifikke T-celler. Produktet etterligner *in vivo* T-celle aktivering via antigenpresenterende celler ved at de tredimensjonale kulene, som er på størrelse med antigenpresenterende celler, er dekket med monoklonale antistoffer mot overflatestrukturene CD3 og CD28. Dette gir en aktivering av signalveiene nedenfor henholdsvis T-celle-reseptor og kostimulatorisk reseptor på T-cellene. Samtidig tilsettes rekombinant humant IL-2, som aktiverer signalveien fra IL-2-reseptoren. Dette stimulerer celleproliferasjonen. Se figur 2.



Figur 2. *Ex vivo* aktivering av en CD4⁺ T-celle. Magnetkuler dekket med antistoffer mot CD3 og CD28, aktiverer signalveiene nedenfor henholdsvis T-celle-reseptor (TCR) og kostimulatorisk reseptor. Rekombinant interleukin-2 (IL-2) stimulerer signalveien fra IL-2-reseptor (IL-R).

1.4.2 Phytohemagglutinin

Phytohemagglutinin-L (PHA-L) er et lecitin som agglutinerer leukocytter, og som fungerer som et mitogen. Humane T-celler kan aktiveres *ex vivo* via interaksjon og direkte binding av PHA til TCR-komplekset. PHA er multivalent og kan binde til flere lymfocytter samtidig. Som en respons på bindingen av PHA kryssbindes TCR-kompleksene i den aktivert T-cellen, og det intracellulære signalet som genereres fra TCR-kompleksene medfører aktivering av en naiv T-celle (23-25).

1.4.3 Andre mitogener

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), ionomycin og concanavalin A er andre mitogener som kan benyttes for aktivering av T-celler. Concanavalin A er i likhet med PHA-L et mitogenisk lecitin som agglutinerer leukocytter og binder direkte til TCR-komplekset på humane T-celler. Studier har visst at bruken av PHA for aktivering har fordeler fremfor bruken av andre mitogener som PMA og ionomycin. Aktivering med PHA kan begrense *in vitro* hendelser (forårsaket av PMA og ionomycin) som ikke pleier å forekomme i den naturlige aktiveringen av T-celler *in vivo*. Et annet negativt moment ved aktivering med PMA og ionomycin er at de gir en rask nedregulering av CD4-overflatemarkøren (23,26).

1.5 Biomarkører

En farmakodynamisk, molekylær biomarkør er et målbart molekyl eller panel av molekyler som korrelerer med et legemiddels effekt eller toksisitet. Biomarkører kan være småmolekylære metabolitter, proteiner, RNA og DNA. En biomarkør som genotype (DNA-polymorfisme/mutasjon) vil i enkelte tilfeller kunne predisponere for legemidlets effekt, mens andre biomarkører (eks. metabolitter) kan få endrede nivåer som en konsekvens av legemidlets virkemekanisme. Graden av den hemmende effekt av de immundempende legemidlene (IC_{50} -verdien) ser ut til å variere for de immundempende legemidlene i forhold til hvilken biomarkør som brukes for å gradere den immunologiske aktiveringskapasiteten (20). Valg av biomarkør som responderer på legemidlet, bør vurderes ut ifra biologisk relevans og selektivitet med hensyn til legemiddeleffekten. Videre bør analysemetodens presisjon, tekniske kompleksitet og tidsforbruk, samt kostnader for utførelsen legges til grunn. For at biomarkøren skal kunne tas i bruk må det dokumenteres at den korrelerer med klinisk effekt av legemidlet og at den vil bidra til forbedret pasientbehandling.

1.5.1 Adenosin 5'-trifosfat

Adenosin 5'-trifosfat (ATP) er en markør på cellenes levedyktighet siden ATP er til stede i alle metabolsk aktive celler, og konsentrasjonen av ATP faller veldig raskt når cellen gjennomgår nekrose eller apoptose (27). De fleste effektorfunksjonene til immunceller er avhengig av cellulær energitilførsel (17). ATP produseres ved cellulær respirasjon, og forbrukes av enzymer og strukturelle proteiner i mange cellulære prosesser, inkludert biosyntetiske reaksjoner og celledeling. ATP er nødvendig for flere signaloverføringsprosesser og brukes av kinaser som kilde til fosfatgrupper i deres fosfatoverføringsreaksjoner. Monitorering av ATP kan benyttes i *in vitro* studier for å vurdere cytotoxiske, cytostatiske og proliferative effekter av mange legemidler (27).

En metode basert på ATP-enderinger i celler som aktiveres, kan brukes til å undersøke cellulær immunstatus under påvirkning av ulike immundempende legemidler og kombinasjoner av disse. Det ble i starten av metodeutviklingen blant annet tatt utgangspunkt i en *ex vivo* metode for måling av global immunrespons hos pasienter som mottar immundempende behandling (CylexTM Immune Cell Function Assay). I denne metoden aktiveres T-celler i fullblod ved hjelp av PHA, og ATP måles deretter i CD4⁺ celler.

1.5.2 WST-1

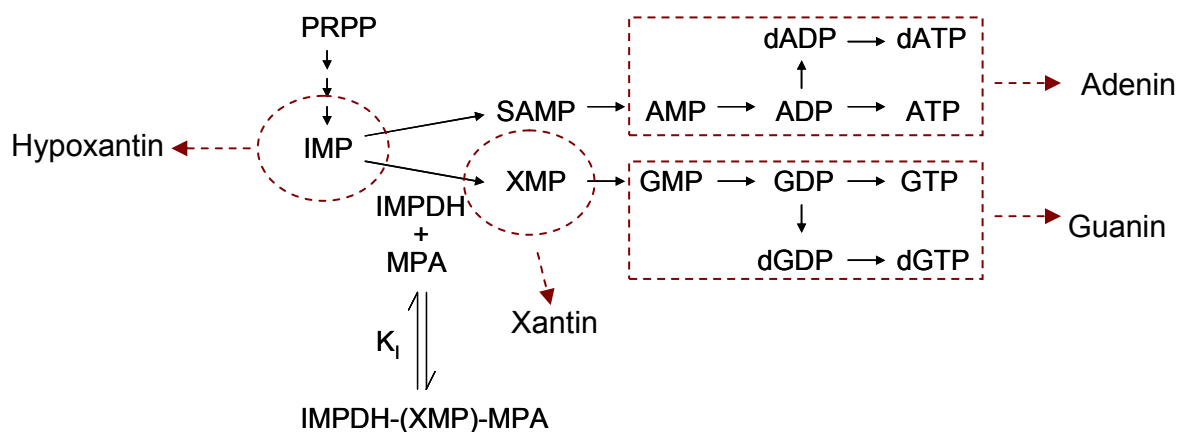
Celleproliferasjon anses å være en god farmakodynamisk biomarkør i *in vitro* undersøkelser siden den kan benyttes ved all T-celle-rettet immunsuppresjon, uavhengig av virkningsmekanisme av legemidlet (20). Cellenes metabolske aktivitet gjenspeiler proliferasjon og viabilitet, og dette kan kvantifiseres basert på tilsetning av celleproliferasjonsreagenset WST-1. Økt aktivitet av mitokondrielle dehydrogenaser gir økt omdannelse av tetrazoliumsaltet WST-1 til en formazan-forbindelse, som igjen kan kvantifiseres kolorimetrisk.

1.5.3 Purinbaser

Celler som aktiveres for å vokse og dele seg vil måtte øke produksjonen av purinnukleotider. Purinnukleotider og -deoksynukleotider brukes henholdsvis til syntese av RNA og DNA.

Enkelte av nukleotidene vil i tillegg ha oppgaver i metabolske prosesser og ved intracellulær signalering. I nysyntesen (*de novo*) av purinnukleotider blir fosforibosylpyrofosfat (PRPP) omdannet til inosinmonofosfat (IMP) via flere enzymkatalyserte trinn. Inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH) katalyserer oksidasjonen av IMP til xantosinmonofosfat (XMP). Fra XMP dannes guaninnukleotider og –deoksynukleotider. Tilsvarende nukleotider av adenin dannes fra IMP via succinyl-adenosinmonofosfat (figur 3).

Det er teknisk krevende å måle spesifikke (deoksy)nukleotider. En forenklet tilnæringsmåte er å spalte av ribosefosfatene ved sur hydrolyse i laboratoriet. Da vil man sitte igjen med de respektive purinbasene som enklere kan analyseres ved kromatografiske metoder. Adenin(deoksy)nukleotider og guanin(deoksy)nukleotider spaltes da til henholdsvis adenin og guanin, mens xantin og hypoxantin deriveres fra sine nukleotidforbindelser (figur 3).



Figur 3. *De novo* syntese av purinnukleotider og mykofenolat (MPA)-mediert hemming av inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH). IMPDH omdanner inosinmonofosfat (IMP) til xantosinmonofosfat (XMP), som videre omdannes til guanin-mono/di/tri-fosfat og deoksyguanin-di/tri-fosfat (GMP, GDP, GTP, dGDP og dGTP). Tilsvarende adenin(deoksy)nukleotider dannes fra succinyl-adenosinmonofosfat (SAMP). Fosforibosylpyrofosfat (PRPP), inhiberingskonstant (K_i).

IMPDH er et sentralt enzym i *de novo* syntesen av guaninnukleotider. Ved nedsatt aktivitet av IMPDH som følge av administrering av mykofenolat, vil det bli dannet mindre guaninnukleotider i lymfocytter. Guanin kan derfor brukes som et potensielt mål på cellenes IMPDH-aktivitet og være en selektiv markør for mykofenolats effekt. Det er i tillegg mulig at andre

immundempende legemidler, som hemmer aktivering og proliferasjon av lymfocytter, vil påvirke nivået av guanin i aktiverte celler.

1.5.4 IMPDH-aktivitet

Aktiviteten av IMPDH er en spesifikk farmakodynamisk markør for enkelte legemidler. Det immundempende legemidlet mykofenolat hemmer selektivt IMPDH. IMPDH-aktivitet kan måles direkte ved inkubering av cellelysatsat der substrat (IMP) og kofaktor (nikotinamid-adenin-dinukleotid) tilsettes. Da vil produksjonshastigheten av XMP, målt som xantin, gjenspeile enzymets aktivitet. Kvantifisert IMPDH-aktivitet i ikke-aktiverte lymfocytter har vist seg å være inverst korrelert med konsentrasjonen av mykofenolat (28). Det er foreløpig ikke beskrevet hvordan mykofenolat påvirker IMPDH i lymfocytter som er aktivert *ex vivo*.

1.6 Celletyper

Isolering av PBMC er en enkel og rask metode for cellebehandling. En ulempe med å benytte PBMC er at aktiveringen og kvantifiseringen ikke blir så spesifikt rettet mot en enkelt celletype, siden PBMC består av både monocytter og T- og B-lymfocytter.

Fordelen med å aktivere T-celler i fortynnet fullblod for deretter å isolere CD4⁺ celler, er at det trengs kun små blodvolumer, ca 50 µL per brønn. I tillegg forblir da cellene mer i sitt normale miljø under aktiveringen, og vil da i større grad respondere tilsvarende som ved naturlig aktivering. Ved å isolere CD4⁺ celler etterpå får man en spesifikk cellepopulasjon hvor man kan kvantifisere biomarkører.

CD4⁺ celler har en sentral rolle ved immunaktivering og videre klonal ekspansjon av antigenspesifikke lymfocytter. Siden effekten av mange av de immundempende legemidlene er rettet mot T-celle funksjonen gjennom spesifikt å hemme T-celle aktivering som kan være indisert av avstøtning, er CD4⁺ celler et relevant valg av celletype for kvantifisering av immuncellers aktiveringskapasitet (17).

2. Hensikt

Immundempende legemidler som brukes av transplanterte pasienter for å hindre avstøtning av organer, har en høy grad av farmakokinetisk variabilitet innen og mellom pasientene. Dosene justeres i dag ofte ut ifra blodkonsentrasjonsmålinger. Det er sannsynlig at det også er en høy grad av farmakodynamisk variabilitet mellom pasientene. Derfor er det mulig at den immundempende behandlingen ytterligere kan individualiseres ved hjelp av cellulære eller molekylære responsmålinger (farmakodynamiske målinger).

Formålet med dette delprosjektet var å utvikle metoder som kan brukes til kvantifisering av immuncellers aktiveringskapasitet. Utvalgte *ex vivo* aktiveringssprinsipper skulle testes ut i ulike cellematerialer fra blodprøver. Molekyler som kan reflektere cellers energistatus og metabolske aktivitet, skulle undersøkes som potensielle markører. Videre skulle det undersøkes om slike målinger egnet seg til å gradere aktiveringskapasitet når de aktiverte immuncellene ble eksponert for immundempende legemidler.

Det langsiktige målet med prosjektet er å undersøke om lymfocyttenes aktiveringskapasitet kan fungere som markør på cellulær immunstatus og effekt av immundempende behandling hos transplanterte pasienter.

3. Materialer

3.1 Utstyr

| Beskrivelse | Navn | Produsent |
|------------------------------|--|--|
| Brett, hvite, 96-brønners | CulturPlate -96 | PerkinElmer, Shelton, CT |
| Celleteller | Z1 Coulter Particle Counter | Beckman Coulter, Brea, CA |
| EDTA-rør | K ₂ EDTA Tubes | BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK |
| Gradient sentrifugerør | BD Vacutainer CPT-rør m/ Na-Heparin, 8 mL | BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK |
| Heparin-rør | Sodium Heparin Tubes | BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK |
| LC-MS/MS | Waters 2795 Separations Module, Waters Quattro micro API | Waters, Manchester, UK |
| Inkubatorskap | Queue 2720 | Leverandør: Heigar, Oslo, Norge |

| | | |
|---|---|--|
| Kolonner LC-MS/MS | Atlantis T3 C18, 3 µm, 2,1 × 150 mm, Atlantis guard T3 C18, 3 µm, 2,1×10 mm | Waters, Manchester, UK |
| Magnet | Dynal MPC-S / MPS-L | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| Plateleser | Wallac 1420 Victor ² Multilabel Counter | PerkinElmer, Waltham, MA |
| Platerister | Wallac 1296-001 Delfia plateshake | PerkinElmer, Waltham, MA |
| Pipette-spisser (ATP-frie) | ART Aerosol Resistant Tips Nucleic Acid & Nuclease Free Non-Pyrogenic | Molecular Bio Products, |
| Polypropylenrør med lav proteinbinding | Protein LoBind Tube 0,5 mL og 1,5 mL | Eppendorf , Hamburg, Tyskland |
| Reagensrør (hvite) | Vacurette, 4 mL | BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK |
| Rulle med tilting | Boule Mixer 820 | Boule Diagnostics Int, Stockholm, Sverige |
| Sentrifuge | Megafuge 1.0 | Heraeus instruments, Hanau, Tyskland |
| Sentrifuge til mikrosentrifugerør | Jouan BR4i | Thermo Scientific, Waltham, MA |
| Sentrifugerør | Falcon, 14 mL Polystyrene Round- Bottom Tube | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ |

| | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| Programvare, nonlineær regresjon | GraFit, versjon 5 | Erithacus Software, Surrey, UK |
| Programvare, LC-MS/MS | MassLynx | Waters, Manchester, UK |
| Ultralydbad | Branson 1210 | Branson, Danbury, CT |
| Vannbad | Grant ristevannbad Modell OLS 200 | Grant, Cambridge, Storbritannia |
| Varmeblokk | Techna Dri-Block, DB-3D | Techne, Cambrigde, UK |
| Vortexmikser | Vortex Genie 2 | Scientific Industries INC, Bohemia, NY |

3.2 Reagenser

| Beskrivelse | Navn | Produsent |
|---------------------------|---|---|
| Acetonitril (ACN) | Acetonitrile, HPLC grade | Rathburn Chemicals, Walkerburn, Scotland |
| $^{13}\text{C}_5$ -adenin | $^{13}\text{C}_5$ -Adenine | Moravek Biochemicals, Brea, CA |
| Adenosinmonofosfat | Adenosine 5'-monophosphate | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| Aktiveringskuler | Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| Ammoniumacetat | Ammonium acetate, LC-MS grade | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| ATP stamløsning | 10 mM ATP, ATPlite | PerkinElmer, Shelton, CT |
| Avkoblingsreagens | DETACHaBEAD CD4 | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| BSA | Albumin solution from bovin serum, 30% | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| Cellelyseringsvæske | Mammalian Cell Lysis Solution, ATPlite | PerkinElmer, Shelton, CT |
| Ditiotreitol | DL-Dithiothreitol | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |

| | | |
|--|---|------------------------------------|
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid, anhydrous | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| FBS | Fetal Bovine Serum | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| FCS | Newborn Calf Serum, from bovine calves | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| Fosfatbuffer | Buffer solution pH 7.0 for HPCE, 50 mM sodium phosphate | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| Fosfatbufret saltvann | PBS, BioWhittaker | Lonza, Verviers, Belgia |
| Frakoblingsreagens | DETAHaBEAD CD4 | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| Frysetørket ATP Standard | Lyophilized ATP Standard Solution, $11,6 \times 10^{-6}$ mol ATP, ATPlite | PerkinElmer, Shelton, CT |
| $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2$ -guanin | Guanine (8- ^{13}C , 7,9- $^{15}\text{N}_2$) | Cambridge Isotope Lab, Andover, MA |
| Guanosinmonofosfat | Guanosine 5'-monophosphate disodium | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| D ₂ -hypoxantin | D ₂ -hypoxanthine | Cambridge Isotope Lab, Andover, MA |
| Inosinmonofosfat (IMP) | Inosine 5'-monophosphate | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |

| | | |
|------------------------------------|---|--------------------------------|
| Interleukin-2 (IL-2) | Interleukin-2, recombinant | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| Isoleringskuler for CD4+ celler | Dynal CD4 Positive Isolation Kit | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| Isoton væske til celletelling | Coulter Isoton II Diluent | Beckman Coulter, Brea, CA |
| Kaliumacetat | Potassium acetate | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| Kaliumklorid (KCl) | Potassium chloride | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| Luciferase- substratbuffer | Substrate Buffer Solution, ATPlite | PerkinElmer, Shelton, CT |
| Luciferase- substratløsning | Lyophilized Substrate Solution, ATPlite | PerkinElmer, Shelton, CT |
| Maursyre | Formic acid, LC-MS grade | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| Nikotinamid- adenindinukleotid | β -Nicotineamide adenine dinucleotide | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| Penicillin-Streptomycin | Pen-Strep 10 000 U penicillin/mL 10 000 U streptomycin/mL | Lonza, Verviers, Belgia |
| Perklorsyre, konsentrert | Perchloric acid 70 % | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |

| | | |
|--------------------------------------|---|------------------------------------|
| Phytohemagglutinin (PHA) | Lectin from Phaseolus vulgaris (red kidney bean) | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| RPMI-1640 | RPMI 1640 with L-Glutamin and NaHCO ₃ | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| tris-hydroklorid (TRIS-HCl) | Trizma buffer substance | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| Vann | Filtrert, ionebyttet vann fra Milli-Q vannrensesystem | Millipore, Billerica, MA |
| WST-1 (Celleproliferasjonsreagens) | Cell Proliferation Reagent WST-1 | Roche Diagnostics, Basel, Sveits |
| ¹⁵ N ₂ -xantin | Xanthine (1,3- ¹⁵ N ₂) | Cambridge Isotope Lab, Andover, MA |
| Xantosin | Xanthosine | Sigma-Aldrich, St.Louis, MO |
| X-vivo | X-vivo 15 without Phenol red and Gentamicin | Lonza, Verviers, Belgia |

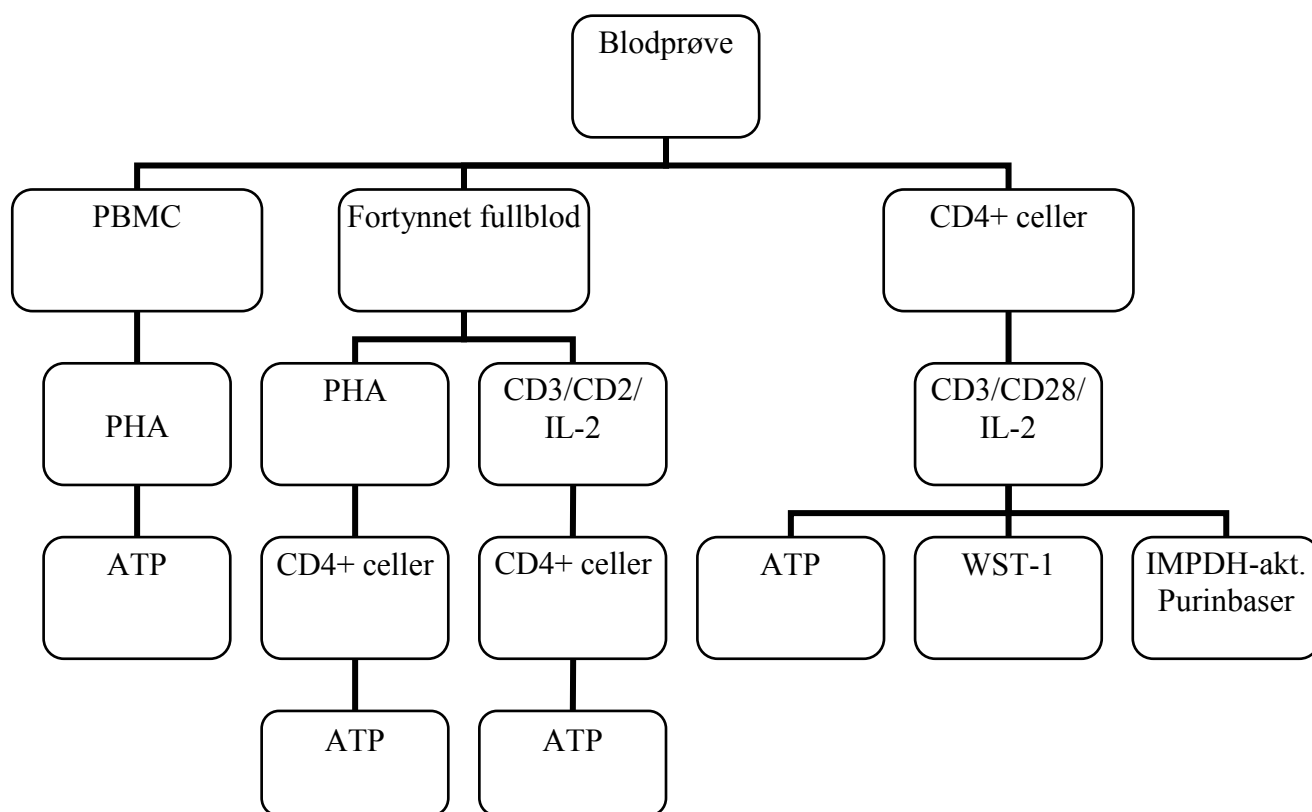
Buffer 1 bestod av PBS u/Ca²⁺ og Mg²⁺ m/0,1 % BSA og 2 mmol/L EDTA.

Buffer 2 bestod av RPMI 1640 m/ 1 % FCS.

4. Metoder

4.1 Metodeutvikling

Det ble i de forskjellige forsøkene prøvd ut ulike kombinasjoner av aktiveringsprinsipper i ulike celletyper. I tillegg ble ulike kvantifiseringsmetoder utprøvd. Se figur 4.



Figur 4. Oversikt over hvilke kombinasjoner av celletyper, aktiveringsprinsipper og kvantifiseringsmetoder som ble utprøvd.

Etiske aspekter

I de tilfeller hvor prøvemateriale fra pasienter ble benyttet til metodeutviklingen, ble det utelukkende brukt overskuddsmateriale fra allerede innsamlede rutineprøver. Det innebar at

ingen ekstra prøvetaking ble gjennomført. Prøvene ble anonymiserte ved at ingen pasientopplysninger ble registrert. Anvendelsen av det biologiske materialet var i tråd med godkjent bruk av "Diagnostikk- og behandlingsbiobank nr. 329" ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus. Prøver fra friske personer ble tatt etter informert samtykke. Der annet ikke er spesifisert i teksten er blodprøver tatt fra friske frivillige.

4.2 Ex vivo aktivering av isolerte PBMC

4.2.1 Celleisolering

Blod ble tappet i gradient-sentrifugerør. Det ble tatt utgangspunkt i rørenes produktbeskrivelse for isolering av mononukleære cellene fra perifert blod (PBMC). Etter tapping av 4 mL blod ble røret vendt forsiktig 8-10 ganger og sentrifugert i romtemperatur ved 1600-1700 g i 20 minutter. Ved sentrifugeringen ble ulike blodkomponenter separert etter tetthet. De mononukleære cellene ble liggende i et hvitt lag over gelen etter sentrifugering, mens erythrocytter og nøytrofile granulocytter passerte gjennom gelen. Over det hvite laget var det plasma med blodplater. De mononukleære cellene ble tatt ut med en pipette og overført til et sentrifugerør. Blodplater og plasmakomponenter ble vasket bort: Det ble tilsatt 5 mL kaldt fosfatbufret saltvann (PBS) og blandet lett ved å vende røret forsiktig 6 ganger. Røret ble sentrifugert ved 300 g i 15 minutter ved romtemperatur. Supernatanten ble fjernet og pelleten resuspendert i 2,5 mL kald PBS. Røret ble sentrifugert ved de samme betingelsene en gang til og supernatanten ble fjernet. Pelleten ble resuspendert i nøyaktig 1 mL medium (X-vivo eller RPMI 1640 m/ L-glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin-streptomycin). Deretter ble de mononukleære cellene talt.

Telling av isolerte PBMC

Det ble benyttet en automatisert celleteller (Z1 Coulter Particle Counter) for å telle de mononukleære cellene. Et volum på 50 µL av celleduspensjonen ble fortynnet i 19,0 mL isoton væske i et tellebeger. Celletelleren ble innstilt for telling av celler i størrelsesområdet 5-15 µm. Fortynningsfaktoren ble satt til 381 for å kompensere forholdet mellom fortynnet og opprinnelig celleduspensjon.

4.2.2 Aktivering med phytohemagglutinin

Isolerte PBMC ble fortynnet til ulike cellekonsentrasjoner i ulike forsøk (5 000, 25 000, 50 000, 1 000 000 celler/mL). Enheter på 95 µL av celleduspensjonen ble overført til brønner i 96 brønners brett. Brettene ble preinkubert i 2 timer ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet. Det ble deretter tilsatt 5 µL phytohemagglutinin (PHA)-løsning til brønner som skulle aktiveres og 5 µL PBS til brønner som ikke skulle aktiveres. PHA ble utprøvd med sluttkonsentrasjon i brønn i området 2,50 - 20,0 µg/mL. Ulike celledyrkingsmedium ble utprøvd (X-vivo i de første forsøkene, og deretter RPMI 1640 m/ L-glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin-streptomycin). Etter tilsettingene ble brettene inkubert i ca 24 timer ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet, før de ble tatt ut for kvantifisering av adenosin 5'-trifosfat (ATP). Innholdet i brønnene ble resuspendert ved å pipettere forsiktig opp og ned i brønnene, før 10 µL fra hver brønn ble overført til brønner i et nytt brett (hvitt). Det ble tilsatt 90 µL medium (RPMI 1640 m/ L-glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin-streptomycin) til hver brønn. Deretter ble prosedyren for kvantifisering av ATP fulgt.

4.3 *Ex vivo* aktivering av T-celler i fullblod

4.3.1 Behandling av fullblod

Fullblod (tappet i heparinrør) ble fortynnet med medium (RPMI 1640 med L-Glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin/streptomycin) i forholdet 1:3. Røret ble vendt 6 ganger for å blande.

4.3.2 Aktivering via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene og etterfølgende isolering av CD4⁺ celler

Produsentens prosedyre for aktivering av T-celler ved hjelp av magnetiserbare kuler dekket med antistoff mot CD3 og CD28 ble fulgt for aktiveringen.

Vask av aktiveringskuler

Aktiveringskulene ble resuspendert ved vortexmiksing i 30 sekunder. Ønsket volum (2 µL per brønn og et overskudd) ble overført til et 1,5 mL polypropylenrør. Deretter ble det tilsatt et tilsvarende volum av Buffer 1 (PBS u/ Ca^{2+} og Mg^{2+} m/0,1 % bovint serum albumin (BSA) og 2 mmol/L etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)) eller minst 1 mL. Dette ble blandet ved vortexmiksing i 5 sekunder. Røret ble satt på magnet i 1 minutt og supernatanten kastet. Kulene ble resuspendert i medium (RPMI 1640 med L-Glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin/streptomycin) i samme volum som det opprinnelige uttaksvolumet av kulesuspensjonen. Det ble tilsatt et tilsvarende volum av rekombinant IL-2 (rIL-2 1560 U/mL i 50 mmol/L fosfatbuffer m/0,1 % BSA). Dette gav en sluttkonsentrasjon av IL-2 i brønn på 30 U/mL.

Aktivering i fortynnet fullblod

Det ble til 96 brønners brett tilsatt 4 µL av blandingen med aktiveringskuler/IL-2 til brønner som skulle aktiveres, og 4 µL PBS m/ 0,1 % BSA til brønner som ikke skulle aktiveres. Deretter ble det tilsatt 196 µL (tilsvarer 49 µL fullblod) av det fortynnede fullblodet til brønnene. Brettene ble satt på en platerister i 1 minutt, før de ble satt i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO_2 og 95 % luftfuktighet. Brettene ble inkubert i ulikt antall timer før de ble tatt ut av inkubatorskap for isolering av CD4^+ celler og kvantifisering av ATP.

Isolering av CD4^+ celler uten etterfølgende fjerning av dynakuler

Produsentens prosedyre for monodisperse magnetkuler dekket med antistoff mot CD4 ble brukt for å isolere aktiverte og ikke-aktiverede CD4^+ celler.

Vask av isoleringskuler

Etter resuspending av isoleringskulene ved lett vortexmiksing, ble et kalkulert volum av kulesuspensjonen (2 µL per brønn, samt et overskudd) overført til et 1,5 mL polypropylenrør. Buffer 1 ble tilsatt i likt volum som uttaksvolumet av kulesuspensjonen, eller minst 1 mL. Etter blanding ble røret satt på magnet i 1 minutt og supernatanten kastet. Kulene ble så resuspendert i Buffer 1 i et volum som gjorde at de ble fortynnet 1:4 med Buffer 1. Dette for å kunne tilsette 10 µL kulesuspensjon ved isoleringen i stedet for 2 µL.

Isolering av CD4⁺ celler

Etter inkuberingen ble brettene avkjølt til 2-8 °C, og blodet fra hver brønn ble overført til hvert sitt rør (4 mL) hvor det allerede var tilsatt 10 µL fortynnete isoleringskuler. Dette ble forsiktig blandet, og rørene ble deretter inkubert på rulle med tilting ved 2-8 °C i 20 minutter. De ble så satt på magnet i 2 minutter og supernatanten kastet. Kulene som nå hadde CD4⁺ celler koblet til seg, ble vasket tre ganger med følgende prosedyre: Resuspending i 500 µL Buffer 1, henstand på magnet i 1 minutt og fjerning av supernatanten. Etter vaskingen ble kulene med CD4⁺ celler tilsatt 360 µL medium/lyseringsvæske (RPMI 1640 med L-Glutamin, 10 % FBS / *mammalian cell lysis solution*) i forholdet 2:1. Rørene ble vortex-mikset i 10 sekunder, deretter sto de i 5 minutter før de ble vortex-mikset igjen i 5 sekunder. Rørene ble satt på magnet i 10 sekunder, og 150 µL av cellelysatet ble straks pipettert til brønn i et 96 brønners brett (hvitt), for kvantifisering av ATP.

4.3.3 Aktivering med phytohemagglutinin og etterfølgende isolering av CD4⁺ celler

Det ble tilsatt 10 µL PHA-løsning (sluttkonsentrasjon i brønn på 5 µg/mL) til brønner som skulle aktiveres og 10 µL PBS til brønner som ikke skulle aktiveres. Deretter ble det tilsatt 190 µL (tilsvarer 47,5 µL fullblod) av det fortynnete fullblodet (jf. 4.3.1) til brønnene. Etter tilsettingene ble brettene inkubert i ulikt antall timer ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet, før de ble tatt ut for isolering og kvantifisering av ATP.

Isolering av CD4⁺ celler uten etterfølgende fjerning av kuler

CD4⁺ cellene ble isolert og klargjort for kvantifisering av ATP i henhold til beskrivelsen under del 4.3.2.

4.4 Ex vivo aktivering av isolerte CD4⁺ celler

4.4.1 Celleisolering

Produsentens prosedyre for monodisperse magnetkuler dekket med antistoff mot CD4 ble brukt for å isolere CD4⁺ celler.

Vask av isoleringskuler

Etter resuspending av isoleringskulene ved vortexmiksing ble 12 µL av kulesuspensjonen per mL fullblod og et overskudd overført til et 1,5 mL polypropylenrør. Buffer 1 ble tilsatt i likt volum som uttaksvolumet av kulesuspensjonen, eller minst 1 mL. Etter blanding ble røret satt på magnet i 1 minutt og supernatanten kastet. Kulene ble så resuspendert i Buffer 1 i likt volum som det opprinnelige uttaksvolumet.

Celleisolering

Rør (4 mL) med EDTA-fullblod ble kjølt ned til 2-8 °C. Det ble tilsatt 48 µL isoleringskuler til hvert rør, og røret ble vendt 6 ganger. Rørene ble så inkubert på rulle med tilting ved 2-8 °C i 20 minutter. Deretter ble de satt på magnet i 2 minutter og supernatanten kastet. Kulene med CD4⁺ celler koblet til seg ble så vasket tre ganger med følgende prosedyre: Resuspending i 2 mL Buffer 1, henstand på magnet i 1 minutt og fjerning av supernatanten. Etter vaskingen ble kulene med CD4⁺ celler resuspenderte i 400 µL Buffer 2 (RPMI 1640 med 1 % FCS) per rør.

Frakopling av magnetkuler

For å fjerne isoleringskulene ble det tilsatt 20 µL frakoblingsreagens per rør før rørene ble inkubert på rulle med tilting ved romtemperatur i 45 minutter. Rørene ble deretter satt på magnet i 1 minutt og supernatanten (som nå var en suspensjon av CD4⁺ celler) ble overført til et nytt reagensrør. Kulene ble vasket med 500 µL Buffer 2, og supernatanten ble overført til cellesuspensjonen. Det ble deretter tilsatt 4 mL av Buffer 2, røret ble vendt 6 ganger og sentrifugert ved 400 g i 6 minutter. Supernatanten ble kastet og cellene ble resuspendert i 100 µL medium (RPMI 1640 med L-Glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin/streptomycin) per mL blod som i utgangspunktet ble brukt til isolering. De CD4⁺ cellene ble talt, og videre fortynnet med samme medium til 800 000 celler/mL.

Telling av isolerte CD4⁺ celler

Det ble benyttet en automatisert celleteller (Z1 Coulter Particle Counter) for å telle CD4⁺ celler. Et volum på 10 µL av cellesuspensjonen ble fortynnet i 19,0 mL isoton væske i et tellebeger. Celletelleren ble innstilt for telling av celler i størrelsesområdet 5-15 µm. Fortynningsfaktoren ble satt til 1901 for å kompensere forholdet mellom fortynnet og opprinnelig cellesuspensjon.

4.4.2 Aktivering via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene

Produsentens prosedyre for aktivering av T-celler ved hjelp av magnetiserbare kuler dekket med antistoff mot CD3 og CD28 ble fulgt for aktivering av CD4⁺ celler.

Vask av aktiveringskuler

Aktiveringskulene ble resuspendert ved vortexmiksing i 30 sekunder. Ønsket volum (2 µL per brønn og et overskudd) ble overført til et 1,5 mL polypropylenrør. Deretter ble det tilsatt et tilsvarende volum av Buffer 1, eller minst 1 mL. Dette ble blandet ved vortexmiksing i 5 sekunder. Røret ble satt på magnet i 1 minutt og supernatanten kastet. Kulene ble resuspendert i medium (RPMI 1640 med L-Glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin/streptomycin) i samme volum som det opprinnelige uttaksvolumet av kulesuspensjonen. Det ble tilsatt et tilsvarende volum av rekombinant IL-2 (rIL-2 1560 U/mL i 50 mmol/L fosfatbuffer m/0,1 % BSA). Dette gir en sluttkonsentrasjon av IL-2 i brønn på 30 U/mL.

Aktivering av isolerte CD4⁺ celler

Enheter på 100 µL av den fortynnede suspensjonen av isolerte celler ble overført til brønn (gav 80 000 CD4⁺ celler per brønn) i et 96 brønners brett. Deretter ble det tilsatt 4 µL aktiveringskuler/IL-2 blanding til brønner som skulle aktiveres, og 4 µL medium til brønner som ikke skulle aktiveres. Brettene ble satt på en platerister i 1 minutt, før de ble satt i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet. Ulike inkuberingstider og markører ble undersøkt.

Brønnene som skulle aktiveres og samtidig inkuberes med mykofenolat, everolimus og sirolimus ble tilsatt 4 µL aktiveringskuler/IL-2. Brønnene som skulle aktiveres og inkuberes med takrolimus, ciklosporin og prednisolon ble tilsatt 4 µL aktiveringskuler/PBS.

4.5 Kvantifisering av molekulære markører

4.5.1 Adenosin 5'-trifosfat

Prinsipp for målemetode

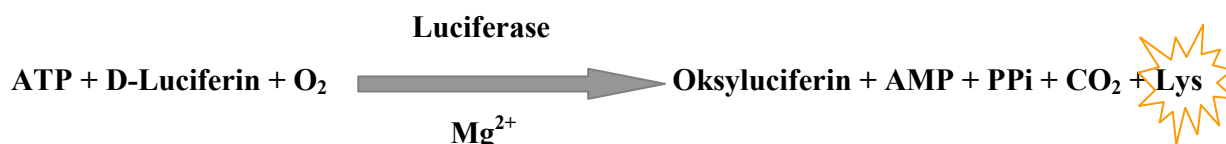
Kvantifiseringen av adenosin 5'-trifosfat (ATP) ble gjennomført i henhold til prosedyrebeskrivelsen for ATPlite (Luminescence ATP Detection Assay System). Kvantifiseringen av ATP skjer ved hjelp av en luciferin/luciferase-koplet reaksjon. ATP er hastighetsbestemmende i omdannelsen av D-luciferin til oksyluciferin, hvor luciferase fungerer som en katalysator. ATPlite systemet er basert på å måle intensiteten av lys (luminescens) forårsaket av reaksjonen hvor ATP omdannes til adenosin 5'-monofosfat (AMP). Luciferase og D-luciferin er tilsatt i konstante mengder. Konsentrasjonen av ATP er proporsjonal med målt intensitet av emittert lys, innen visse grenser (Figur 5).

Praktisk utførelse

For brettene med inkuberte CD4⁺ celler, ble suspensjonen resuspendert ved å pipettere forsiktig opp og ned. Det ble overført 90 µL til 1,5 mL polypropylenrør. Et volum på 500 µL PBS ble tilsatt og blandet. Rørene ble sentrifugert ved 1100-1200 g i 2 minutter ved 4 °C (Jouan BR4i). Det ble pipettert ut et fast volum på 560 µL for å få fjernet så mye cellemedium og dermed ATP utenfor cellene, som mulig. Pelleten ble resuspendert i 200 µL medium:lyseringsvæske (RPMI 1640 med L-Glutamin, 10 % FBS / *mammalian cell lysis solution*) i forholdet 2:1. Rørene ble vortex-mikset i 10 sekunder, deretter sto de i 5 minutter før de ble vortex-mikset igjen i 5 sekunder. Rørene ble satt på magnet i 10 sekunder, og 150 µL av cellelysatsat ble straks pipettert til brønn i et 96 brønners brett (hvitt).

Brettene (hvite) med 150 µL i hver brønn (PBMC cellelysatsat og CD4⁺ celler isolert fra aktivering i fortynnet fullblod, og aktiverte CD4⁺ celler) fra de ulike forsøkene var allerede tilsatt medium:lyseringsvæske. Tilsettingen av lyseringsvæske førte til lysering av cellene, og samtidig stabilisering av ATP. I neste trinn ble hver brønn tilsatt 50 µL substratbuffer, bestående av en blanding av bufferløsning og frysetørket substrat (luciferase/D-luciferin). Brettene ble ytterligere ristet i 5 minutter. Substratbufferen er nødvendig for omdannelsen av D-luciferin til oksyluciferin. Lyset som ble produsert under den D-luciferin/luciferase-koplete reaksjonen, ble målt ved hjelp av en luminescens-plateleser (Wallac 1420 Victor² Multilabel Counter).

Intensiteten av emittert lys blir avlest i plateleseren som *counts per second* / *antall per sekund* (CPS). Vanlig lys kan forårsake plate-fosforescens i de hvite brettene som ble brukt, noe som vil resultere i høyere bakgrunnsnivåer. Fosforescens har en halveringstid på flere minutter. Brettet ble derfor satt inn i plateleseren for mørkeadaptasjon i 10 minutter før luminescens ble målt.



Figur 5. Kvantifisering av adenosin 5'-trifosfat (ATP) ved hjelp av en luciferin/luciferase-koplet reaksjon. Reaksjonsproduktene er oksyluciferin, adenosin 5'-monofosfat (AMP), pyrofosfat (PPi), CO₂ og lys.

Standardkurver for ATP

For å kunne kvantifisere intracellulær ATP etter lysering av cellene laget vi standardkurver basert på prosedyrebeskrivelsene for ATPlite (ATP standard). Frysetørket ATP standard ble rekonstituert med filtrert, ionebyttet vann (Milli-Q vannrensesystem) til en 10,0 mmol/L (10,0 mM) ATP-løsning. Til et glass med ATP standard som var deklart med $11,6 \times 10^{-6}$ mol ATP ble det tilsatt 1160 µL vann. Glasset ble vendt i 1 minutt for fullstendig oppløsning. Det ble laget en fortynningsserie av ATP standard som ga sluttkonsentrasjoner i brønn på 0,05 - 0,10 - 0,20 - 0,40 - 0,80 - 1,00 µmol/L ATP. Det ble tilsatt 90 µL medium (X-vivo) til brønnene. Det ble så tilsatt 50 µL lyseringsvæske til hver brønn. Dette ble blandet på en platerister i 5 minutter. Deretter ble 10 µL ATP standard tilsatt og brettet ristet i 5 minutter. Tilslutt ble 50 µL substratbuffer tilsatt og brettet ytterligere ristet i 5 minutter. Platen ble mørkeadaptert i 10 minutter før måling av luminescens. Hvite 96 brønners brett ble brukt i forbindelse med kvantifiseringen av ATP-avhengig luminescens.

ATP-målinger i ulike cellekonsentrasjoner – vurdering av måleområde

Det ble målt ATP-avhengig luminescens i ulike cellekonsentrasjoner av PBMC fortynnet fra 2 000 000 celler/mL og ned til 5 000 celler/mL. Volumer på 100 µL PBMC-cellesuspensjon og 50 µL lyseringsvæske ble tilsatt til brønnene, og brettene ble ristet i 5 minutter. Deretter ble 50 µL substratbuffer tilsatt og brettet ytterligere ristet i 5 minutter. Platen ble så mørkeadaptert i 10 minutter og luminescens lest av.

I et annet forsøk ble det målt ATP-avhengig luminescens i cellesuspensjoner av PBMC inneholdende 20 000 og 50 000 celler/mL, som ble tilsatt ATP i konsentrasjoner fra 1,00 $\mu\text{mol/L}$ per brønn og ned til 0,05 $\mu\text{mol/L}$. Volumer på 90 μL PBMC-cellessuspensjon og 50 μL lyseringsvæske ble tilsatt til brønnene, og brettene ble ristet i 5 minutter. Så ble det tilsatt 10 μL ATP standard (ulike konsentrasjoner) og brettet ristet i 5 minutter. Deretter ble 50 μL substratbuffer tilsatt og brettet ytterligere ristet i 5 minutter. Platen ble mørkeadaptert i 10 minutter og luminescens lest av.

Innen-serie-presisjon

I en serie ble det først kjørt en ATP kalibratorrekke, deretter en lav, middels og høy ATP kontroll (0,05 - 0,75 - 1,50 $\mu\text{mol/L}$ i brønn) 5 ganger etter hverandre i samme analyseserie. Ut ifra disse gjentatte analysene over en kort tidsperiode under identiske betingelser ble variasjonskoeffisienten (VK) bestemt for hver av de tre konsentrasjonene. VK (%) tilsvarer det relative standardavviket og utregnes ved å dividere standardavviket på gjennomsnittet, for deretter å multiplisere med 100. I tillegg ble gjennomsnittlig nøyaktighet (%) utregnet.

Mellom-serie-presisjon

I mange av forsøkene ble det målt ATP-avhengig luminescens av en ATP-kontroll (0,50 $\mu\text{mol/L}$ i brønn) først i serien og sist i hver analyseserie. Utregning av VK (%) vil gjenspeile spredningen i målingene av ATP-avhengig luminescens fra ulike forsøk, fra samme laboratorium, men fra ulike dager. Gjennomsnittlig nøyaktighet (%) ble også utregnet.

4.5.2 WST-1

Kvantifiseringen av celleproliferasjon og cellelevedyktighet basert på celleproliferasjonsreagenset WST-1 og kolorimetri ble utført i henhold til prosedyrebeskrivelsen for Cell Proliferation Reagent WST-1.

Metoden går ut på at man tilsetter tetrazoliumsaltet WST-1 for deretter å måle mengde formazan-farge som dannes. Tetrazoliumsalter kløyves av cellulære enzymer til formazan, som gir en mørk rød farge. En ekspansjon av levedyktige celler i en prøve resulterer i økt aktivitet av mitokondrielle dehydrogenaser. Denne økte aktiviteten av slike mitokondrielle

dehydrogenaser gir økt omdannelse av WST-1 til formazan-farge. Se figur 6. Intensiteten av formazan-fargen som produseres korresponderer direkte til antall metabolsk aktive celler i prøven. Det forventes en økt dannelse av formazan-farge i de aktiverte cellene i forhold til i de ikke-aktiverte cellene. Dannet formazan-farge kvantifiseres ved en absorbans på 450 nm med en kolorimetrisk metode i en plateleser (Wallac 1420 Victor² Multilabel Counter).



Figur 6. Celleproliferasjonsreagenset WST-1 omdannes av mitokondrielle dehydrogenaser til en formazan-forbindelse.

Etter inkubering ble det tilsatt 10 μ L WST-1 per brønn med 100 μ L aktiverte eller ikke-aktiverte CD4⁺ celler. Brettet ble forsiktig ristet på en platerister i 1 minutt og inkubert i 4 timer ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet. Etter uttak fra inkubatoren ble brettet dekket med lysbeskyttende aluminiumsfolie for å begrense bakgrunnsabsorbansen, og ristet på en platerister i 1 minutt. Brettet ble tatt ut av aluminiumsfolien og lest av i plateleseren.

4.5.3 Purinbaser og IMPDH-aktivitet

Kvantifisering av purinbaser og IMPDH-aktivitet ved hjelp av LC-MS/MS

Etter inkubering i inkubatorskap ble de CD4⁺ cellene resuspendert ved forsiktig pipettering opp og ned fem-seks ganger. Cellesuspensjonen i den enkelte brønn ble overført til 1,5 mL mikrosentrifugerør, hvor 500 μ L kaldt fosfatbufret saltvann (PBS) ble tilsatt. Suspensjonen ble blandet forsiktig ved vending av røret, som deretter ble sentrifugert ved 1200 g i 2 minutter ved 4 °C (Jouan BR4i). Supernatanten ble dekantert av, og 120 μ L PBS ble deretter tilsatt til resuspending av cellene. Prøvene ble fryst ned og lagret ved -20 °C.

Den frosne cellesuspensjonen ble tint i 20 minutter ved romtemperatur. Cellelysatet ble homogenisert ved vortex-miksing i 30 sekunder, ultralydbad i 120 sekunder, og påfølgende vortex-miksing i 10 sekunder. Lysatet ble deretter sentrifugert ved 1200 g i 2 minutter ved 4 °C (Jouan BR4i).

Et supernatantvolum på 50 µL ble overført til 1,5 mL mikrosentrifugerør. Tilsvarende ble det overført 50 µL kalibrator- eller kontrollmateriale til aktuelle rør. Til alle rør ble det tilsatt en buffer som inneholdt tris-hydroklorid (TRIS-HCl) 250 mmol/L, EDTA 7,50 mmol/L, kaliumklorid (KCl) 250 mmol/L og ditiotreitol 5,00 mmol/L. Det ble så tilsatt 25 µL vann til kalibratører, samt til prøver og kontroller hvor purinbaser skulle måles (dvs. de som ikke skulle inkuberes for å måle IMPDH-aktivitet, og samtidig ble disse brukt for å undersøke bakgrunnsnivå av xantin). Til prøvene hvor IMP dehydrogenase (IMPDH)-aktivitet skulle kvantifiseres, ble det tilsatt 25 µL substrat/kofaktor-løsning som inneholdt inosinmonofosfat (IMP) 9,00 mmol/L og nikotinadenindinukleotid 2,00 mmol/L. Rørene ble vortex-mikset 5 sekunder, og de sistnevnte hvor enzymreaksjonen skulle gjennomføres ble inkubert 120 minutter ved 37 °C i vannbad. Ved disse betingelsene måles den maksimale reaksjonshastigheten til IMPDH, der xantosinmonofosfat (XMP) dannes fra IMP (29).

Det ble tilsatt 20 µL perklorsyre 4,0 mol/L til hvert rør. Dette stopper enzymreaksjonen og proteiner feller ut. Deretter ble det tilsatt 20 µL internstandardløsning som inneholdt ¹⁵N₂-xantin, D₂-hypoxantin, ¹³C, ¹⁵N₂-guanin og ¹³C₅-adenin (25,0 µmol/L av hver). Rørene ble vortex-mikset i 10 sekunder, sentrifugert 4 minutter ved 9400 g (Jouan BR4i), og 120 µL supernatant ble overført til flatbunnet glass-insert i 2 mL vial. Korker ble satt på, og rørene ble satt i varmblokk i 60 minutter ved 100 °C. Denne prosessen medfører at frie purinbaser dannes ved at ribosefosfater spaltes fra purinnukleotider.

Vialene ble så avkjølt i 10 minutter ved romtemperatur, og 15 µL kaliumacetat 4,0 mol/L ble tilsatt for å felle ut perklorat. Etter 5 sekunder vortex-miksing ble vialene sentrifugert 5 minutter ved 2000 g, og så plassert i kromatografiinstrumentets autosampler.

Purinbasene xantin, hypoxantin, guanin og adenin ble kvantifisert ved hjelp av en analysemetode basert på væskechromatografi koplet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS). Instrumentet bestod av en kromatografimodul (Waters 2795 Separations Module) og

en MS/MS med elektrospray (Waters Quattro micro API). Dataprogrammet Waters MassLynx ble brukt til å styre alle prosessene.

Revers-fase væskeskromatografi ble anvendt for å separere analyttene fra injeksjonsfronten. Den analytiske kolonnen var en Atlantis T3 C18 3 μm , 2,1 \times 150 mm, med forkolonnen Atlantis T3 C18 3 μm , 2,1 \times 10 mm. Mobilfasen bestod av 3,0 % acetonitril i vann, tilsatt 0,1 % maursyre og 2,0 mmol/L ammoniumacetat. Denne ble pumpet med hastighet 0,150 mL/min. Injeksjonsvolum var 30 μL . Injeksjonsnålen ble vasket med 5 % acetonitril mellom hver injeksjon. Prøvene ble injisert med 8 minutters mellomrom, og mobilfasen ble ført inn i massespektrometeret mellom 4,5 og 7,9 minutter.

Elektrospray ble brukt som fordampings-/ioniseringsteknikk i ionekilden, hvor positive ioner ble akselerert inn i massespektrometeret. Kapillærspenningen ble satt til 3,00 kV. Ionekildetemperaturen var 120 °C og gassfasetemperaturen var 400 °C. Nitrogen ble brukt som nebulisatorgass og cone-gass med hastighet på henholdsvis 650 L per time og 50 L per time. Molekylionene ble fragmentert ved hjelp av argongass justert til $3,5 \times 10^{-3}$ mBar. De spesifikke betingelsene for hvert enkelt molekylions masse/ladning (m/z)-overgang er angitt i Tabell A.

Toppene i kromatogrammene ble integrert, og ratio mellom analyttene og internstandardenes toppareal ble brukt som respons. Konsentrasjonsberegning var basert på lineære kalibreringskurver med 1/x vekting (ikke tvunget gjennom origo). Kalibratorenes konsentrasjoner var følgende: Xantosin og guanosinmonofosfat 0,50 – 2,50 – 10,0 – 25,0 – 50,0 $\mu\text{mol/L}$, IMP 0,25 – 1,00 – 5,00 – 15,0 – 30,0 $\mu\text{mol/L}$ og adenosinmonofosfat 1,00 – 5,00 – 20,0 – 50,0 – 100 $\mu\text{mol/L}$. Ved oppvarmingen i varmeblokk ble kalibratorene hydrolysert til de respektive purinbasene. Enzymaktiviteten av IMPDH ble beregnet som produksjonshastigheten av XMP gjennom inkuberingsintervallet (pmol/ 10^6 celler/time).

Tabell A. Betingelser for masse/ladning (m/z)-overganger

| Analytt (Internstandard) | Forløperion (m/z) | Produktion (m/z) | Dwell-tid (sek) | Cone-spenning (V) | Kollisjons- energi (eV) |
|--|----------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-------------------------------|
| Xantin | 152,95 | 109,95 | 0,300 | 32 | 17 |
| (¹⁵ N ₂ -xantin) | 154,95 | 110,97 | 0,300 | 34 | 17 |
| Hypoxantin | 136,90 | 109,95 | 0,300 | 40 | 20 |
| (D ₂ - hypoxantin) | 138,98 | 110,98 | 0,300 | 40 | 18 |
| Guanin | 151,95 | 134,95 | 0,250 | 37 | 18 |
| (¹³ C, ¹⁵ N ₂ - guanin) | 154,96 | 137,96 | 0,250 | 35 | 17 |
| Adenin | 135,95 | 118,95 | 0,125 | 39 | 20 |
| (¹³ C ₅ -adenin) | 141,03 | 123,91 | 0,125 | 39 | 20 |
| Protonerte molekyler (positive ioner) ble analysert ved hjelp av multiplere reaksjonsmonitorering (MRM). | | | | | |

4.6 Aktiveringskapasitet

CD4⁺ celler ble i et forsøk eksponert for de immundempende legemidlene ciklosporin, takrolimus, everolimus, sirolimus og prednisolon i økende konsentrasjoner. Dette for å evaluere T-cellenes (her CD4⁺ cellenes) sensitivitet overfor disse legemidlene.

Enheter på 100 µL av den fortynnede suspensjonen av isolerte CD4⁺ celler ble overført til brønn (gav 80 000 CD4⁺ celler per brønn) i et 96 brønners brett. Deretter ble det tilsatt 4 µL aktiveringskuler/IL-2 eller 4 µL aktiveringskuler/PBS til brønner som skulle aktiveres, og 4 µL medium til brønner som ikke skulle aktiveres. Det ble tilsatt 1 µL av legemiddelløsningene (løst i metanol) til de aktuelle brønnene. Brønner som ikke skulle tilsettes legemiddel ble tilsatt 1 µL metanol. Brettene ble satt på en platerister i 1 minutt, før de ble satt i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet i 48 timer. For kvantifisering ble det etter inkubering tilsatt 10 µL WST-1 til hver brønn. Brettene ble ristet forsiktig på en platerister i 1 minutt før de ble inkubert i 4 timer ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet. Etter uttak fra inkubatoren ble brettet dekket med lysbeskyttende aluminiumsfolie for å begrense bakgrunnsabsorbansen, og ristet på en platerister i 1 minutt. Brettet ble tatt ut av aluminiumsfolien og lest av i plateleseren.

Brønnene med isolerte CD4⁺ celler som skulle aktiveres via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene og samtidig inkuberes med mykofenolat, everolimus og sirolimus ble tilsatt 4 µL aktiveringskuler/IL-2. Brønnene som skulle inkuberes med takrolimus, ciklosporin og prednisolon ble tilsatt 4 µL aktiveringskuler/PBS. Tilsetting av IL-2 ble for ciklosporin og takrolimus utelatt fordi disse legemidlene virker ved å hindre signaleringen nedenfor T-celle-reseptor og dermed produksjonen av IL-2. Prednisolon nedsetter også produksjonen av IL-2. Ved å tilsette IL-2 sammen med disse legemidlene, ville man ha motarbeidet deres virkningsmekanisme og fått en uriktig hemmingseffekt. Det er derimot ikke unnlatt å tilsette IL-2 i prøvene med mykofenolat, everolimus og sirolimus, siden disse legemidlene virker på celler som er kommet lengre i aktiveringsprosessen. IL-2 er tilsatt for å stimulere proliferasjonen.

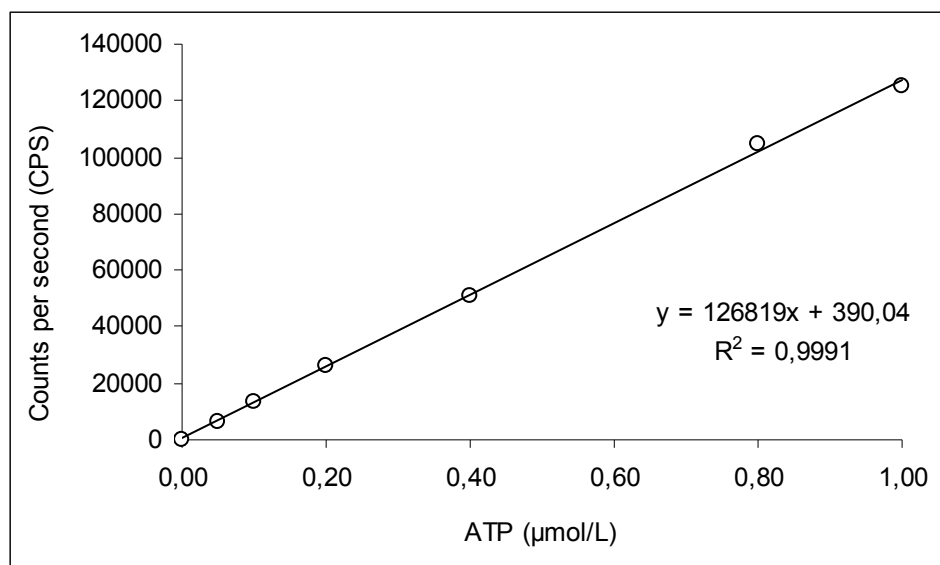
5. Resultater

5.1 Pålitelighet av kvantifiseringsmetoder

5.1.1 ATP-avhengig luminescens

Standardkurver for adenosin 5`-trifosfat

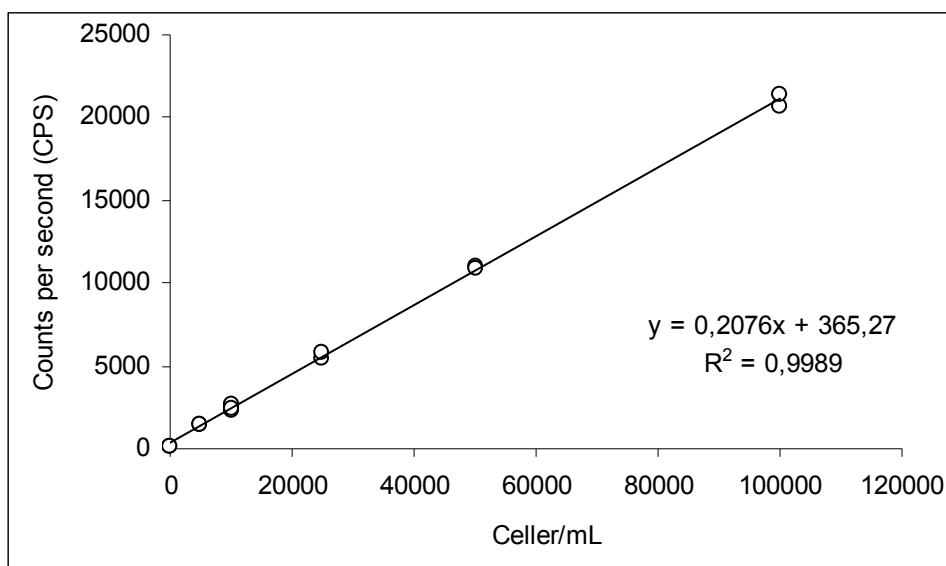
Det ble laget standardkurver ut i fra vandige standardløsninger med sluttkonsentrasjoner i brønn på 0,05 - 0,10 - 0,20 - 0,40 - 0,80 - 1,00 $\mu\text{mol/L}$ ATP. Figur 7 viser et eksempel på en representativ standardkurve for ATP der luminescens er benyttet som kvantifiseringsmetode. Luminescensmålingene viste stor grad av linearitet i måleområdet opp til 1,00 $\mu\text{mol/L}$ ATP i brønn, ($R^2 \approx 1,00$).



Figur 7. Lineær standardkurve for adenosin 5`-trifosfat (ATP) kvantifisert ved luminescens i vandige standardløsninger.

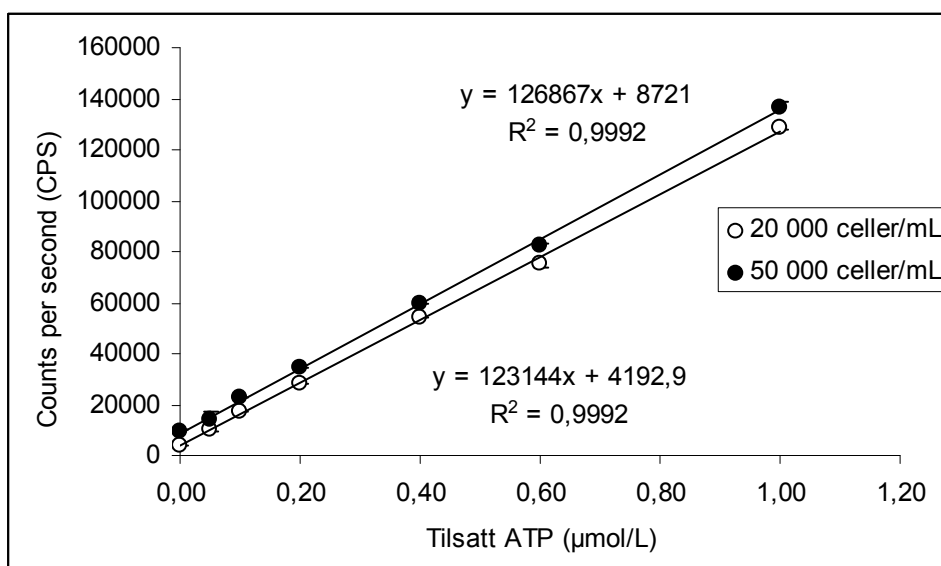
ATP-målinger i ulike cellekonsentrasjoner

Det ble målt ATP-avhengig luminescens i cellesuspensjoner av mononukleære celler i perifert blod (PBMC) fortynnet til konsentrasjoner fra 2 000 000 celler/mL og ned til 5 000 celler/mL, for å se på forholdet mellom målt ATP og celletall. Det ble funnet en akseptabel lineær sammenheng mellom målt ATP-avhengig luminescens og PBMC fortynnet i området 5 000-100 000 celler/mL, ($R^2 \approx 0,9989$). Se figur 8.



Figur 8. Lineær sammenheng mellom ATP-avhengig luminescens og celledtall. Mononukleære celler i perifert blod (PBMC) fortynnet i området 5 000-100 000 celler/mL. Duplikater av hver cellekonsentrasjon er plottet i figuren.

I et annet forsøk ble det målt ATP-avhengig luminescens i fortynnede cellesuspensjoner av PBMC (20 000 og 50 000 celler/mL) som ble tilsatt ATP-standard i konsentrasjoner i brønn på 0,05 – 0,10 – 0,20 – 0,40 – 0,80 – 1,00 $\mu\text{mol/L}$. Ved begge cellekonsentrasjoner viste ATP-målingene god linearitet i dette området ($R^2 = 0,9992$). Se figur 9.



Figur 9. Linearitet for ATP-avhengig luminescens i cellesuspensjoner. ATP er tilsatt til cellesuspensjoner av PBMC inneholdende 20 000 celler/mL og 50 000 celler/mL. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

Presisjon og nøyaktighet innenfor analyseserie

Analysemetoden for ATP-avhengig luminescens ble validert i forbindelse med metodeutviklingen. ATP-kontroller ved lave, middels og høye konsentrasjoner (0,05 – 0,75 – 1,50 µmol/L per brønn) ble analysert i en enkelt analyseserie. Presisjon og gjennomsnittlig nøyaktighet er angitt i Tabell B.

Tabell B. Innen-serie presisjon og nøyaktighet ved måling av adenosin 5'-trifosfat

| Analytt | Konsentrasjon i brønn (µmol/L) | Variasjons-koeffisient (%) | Gjennomsnittlig nøyaktighet (%) | Antall |
|-----------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|--------|
| Adenosin 5'-trifosfat | 0,05 | 2,6 | 96 | 5 |
| | 0,75 | 0,8 | 99 | 5 |
| | 1,50 | 3,6 | 104 | 5 |

Validering er utført ved å analysere vandige kontroller med kjente konsentrasjoner.

Hver kontroll er analysert i fem paralleller innenfor samme analyseserie.

Variasjonskoeffisient = standardavvik/gjennomsnitt × 100 %.

Presisjon og nøyaktighet mellom analyseserier

En ATP-kontroll ved middels konsentrasjon (0,50 µmol/L i brønn) ble målt først og sist i hver analyseserie. Presisjon og gjennomsnittlig nøyaktighet er angitt i Tabell C.

Tabell C. Mellom-serie presisjon og nøyaktighet ved måling av adenosin 5'-trifosfat

| Analytt | Konsentrasjon i brønn (µmol/L) | Variasjons-koeffisient (%) | Gjennomsnittlig nøyaktighet (%) | Antall |
|-----------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------|
| Adenosin 5'-trifosfat | 0,50 | 8,1 | 105 | 54 (27 serier) |

Validering er utført ved å analysere vandige kontroller med kjente konsentrasjoner.

Kontrollen er analysert først og sist i hver av analyseseriene.

Variasjonskoeffisient = standardavvik/gjennomsnitt × 100 %.

5.1.2 Purinbaser målt ved LC-MS/MS

Analysemetodens presisjon og nøyaktighet mellom serier er tidligere blitt preliminært validert i laboratoriet. Resultater ved lave, middels og høye konsentrasjoner av xantin, hypoxantin, guanin og adenin er angitt i Tabell D som mål på metodens pålitelighet.

Tabell D. Mellom-serie presisjon og nøyaktighet ved måling av purinbaser

| Analytt | Tilsatt konsentrasjon (µmol/L) | Variasjonskoeffisient (%) | Gjennomsnittlig nøyaktighet (%) | Antall |
|------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------|
| Xantin | 0,50 | 4,4 | 97,6 | 5 |
| | 10,0 | 2,3 | 102 | 5 |
| | 50,0 | 1,1 | 100 | 5 |
| Hypoxantin | 0,25 | 14,0 | 102 | 5 |
| | 5,00 | 2,9 | 101 | 5 |
| | 30,0 | 2,1 | 100 | 5 |
| Guanin | 0,50 | 2,8 | 97,2 | 5 |
| | 10,0 | 1,6 | 101 | 5 |
| | 50,0 | 1,5 | 100 | 5 |
| Adenin | 1,00 | 4,7 | 99,8 | 5 |
| | 20,0 | 1,1 | 100 | 5 |
| | 100 | 1,9 | 100 | 5 |

Preliminær validering er utført ved å analysere vandige kontroller med kjente konsentrasjoner.

Hver kontroll er analysert i fem separate analyseserier.

Variasjonskoeffisient = standardavvik/gjennomsnitt \times 100 %.

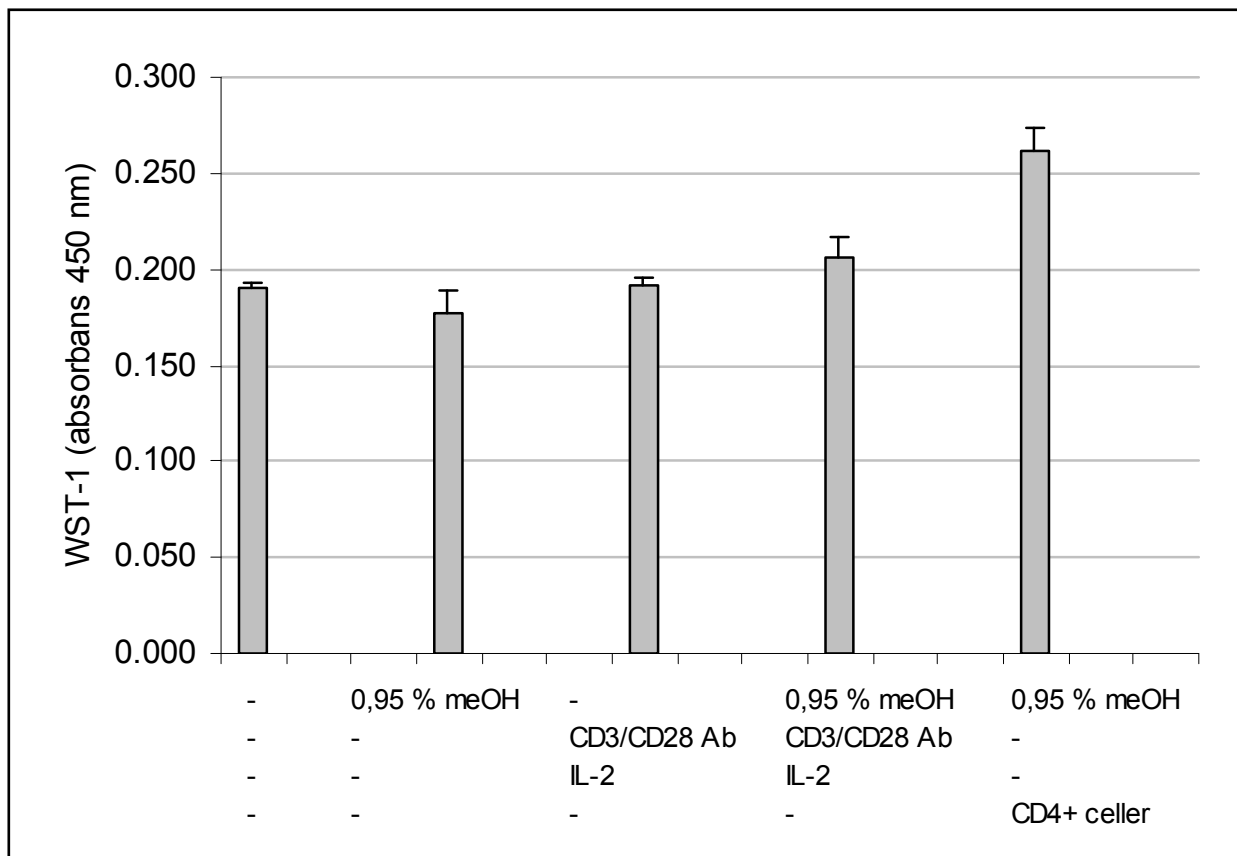
5.1.3 Mitokondriell dehydrogenaseaktivitet (WST-1)

Testing av hvordan reagenser eventuelt påvirker absorbans og celleaktivering

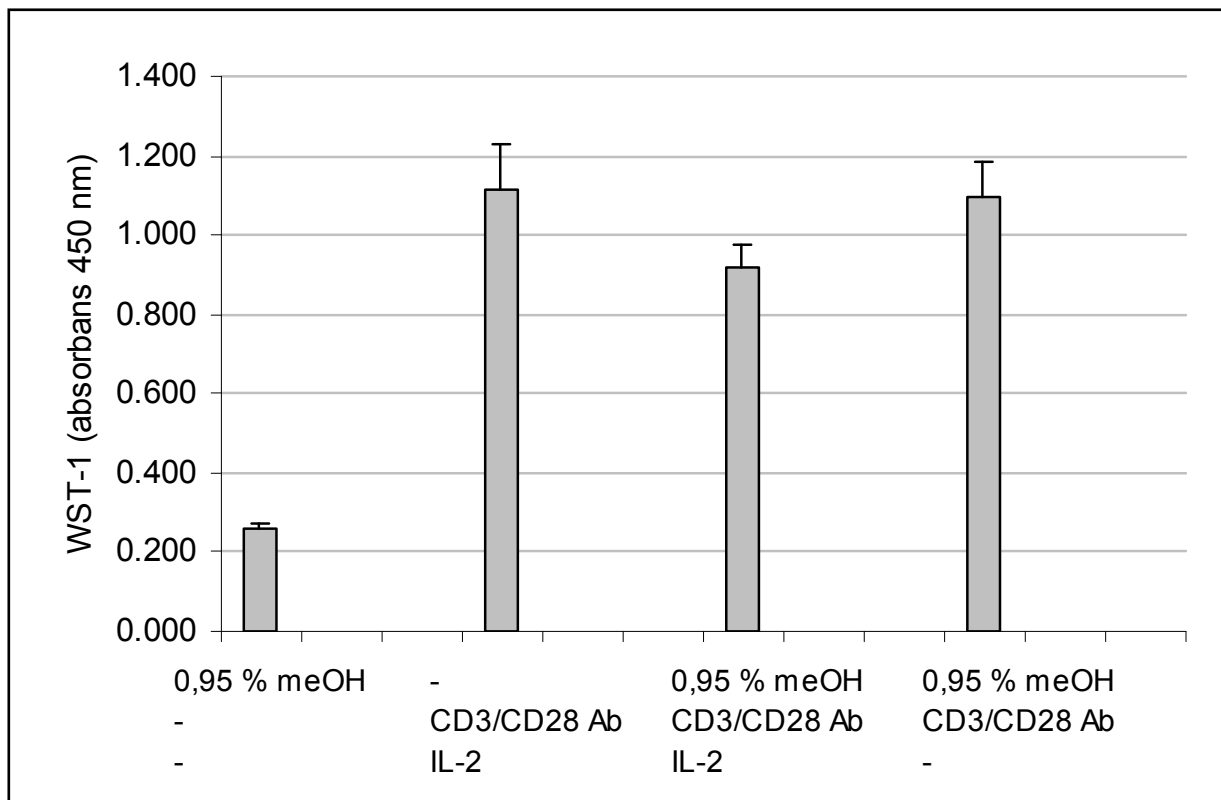
Celleproliferasjonsreagenset WST-1 ble utprøvd som metabolsk markør i isolerte CD4⁺ celler som var aktivert via CD3/CD28 og IL-2-reseptor. Det var ønskelig å finne ut om noen av reagensene påvirket bakgrunnsabsorbans eller selve aktiveringsnivået. Ulike reagenskombinasjoner ble testet ut i brønnene; medium, CD4⁺ celler, metanol, aktiveringskuler dekket med antistoffer mot CD3/CD28 og IL-2.

Ingen av reagensene (metanol, aktiveringskuler med antistoff mot CD3/CD28, IL-2) gav markant utslag på bakgrunnsabsorbansen. I tråd med at også hvilende celler vil ha mitokondriell aktivitet, ble det observert noe høyere absorbans i brønner med ikke-aktiverte CD4⁺ celler (ca. 40 %). Se figur 10.

CD4⁺ celler som var inkubert med CD3/CD28-aktiveringskuler og IL-2, eller kun aktiveringskuler, genererte 3-4 ganger høyere absorbans enn ikke-aktiverte celler. Det var en tendens til at metanoltilsetningen medførte noe lavere absorbansnivå (ca. 20 %) der både aktiveringskuler og IL-2 var tilsatt. Samtidig indikerte forsøket at IL-2 ikke hadde noen positiv effekt på målt absorbans (figur 11). De relative standardavvikene (VK, n = 3) for målingene i aktiverte celler var i området 6,1-10,6 %.



Figur 10. Reagenspåvirkning av bakgrunnsabsorbans. Ulike reagenskombinasjoner (og CD4+ celler) tilsatt WST-1. Ingen av kombinasjonene medførte celleaktivering. Formazan-farge målt ved absorbans på 450 nm. Kategoriaksen for X-aksen beskriver innholdet av hver reagenskombinasjon. Alle brønner inneholdt 100 µL medium (RPMI 1640 med L-Glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin/streptomycin). Metanol = meOH. Inkuberingstid: 48 timer. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).



Figur 11. Reagenspåvirkning av celleaktivering. CD4⁺ celler ble tilsatt ulike reagenskombinasjoner og inkubert 48 timer. Deretter ble de inkubert med WST-1 og produsert formazan-farge ble målt ved absorbans på 450 nm. Kategoriaksen for X-aksen beskriver innholdet av hver reagenskombinasjon. Alle brønner inneholdt celler i 100 µL medium (RPMI 1640 med L-Glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin/streptomycin). Metanol = meOH. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

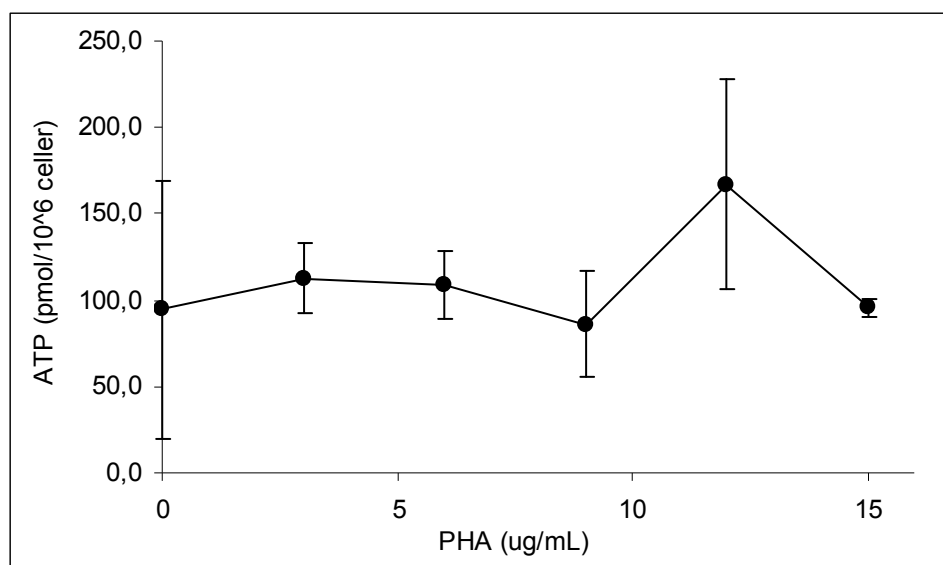
5.2 Utprøving av aktiveringsmetoder

5.2.1 Aktivering av isolerte PBMC

Siden isolering av PBMC innebærer en velkjent, enkel og rask metode for cellebehandling, ble det først forsøkt å aktivere denne populasjonen av mononukleære blodceller..

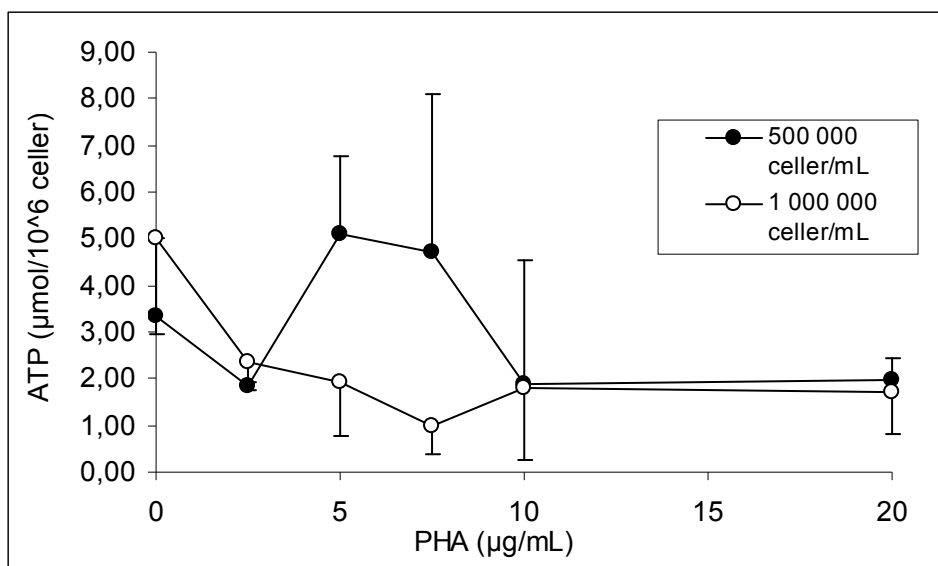
Phytohemagglutinin

Stimulering av PBMC med PHA var en av aktiveringsmetodene som ble prøvd ut i metodeutviklingen. Innledende ble ulike konsentrasjoner av PHA tilsatt (3,00 – 6,00 – 9,00 – 12,0 – 15,0 µg/mL i brønn), ved en cellekonsentrasjon på 50 000 celler/mL. X-vivo ble brukt som dyrkingsmedium. Ingen systematiske endringer av ATP-nivået ble observert (figur 12).



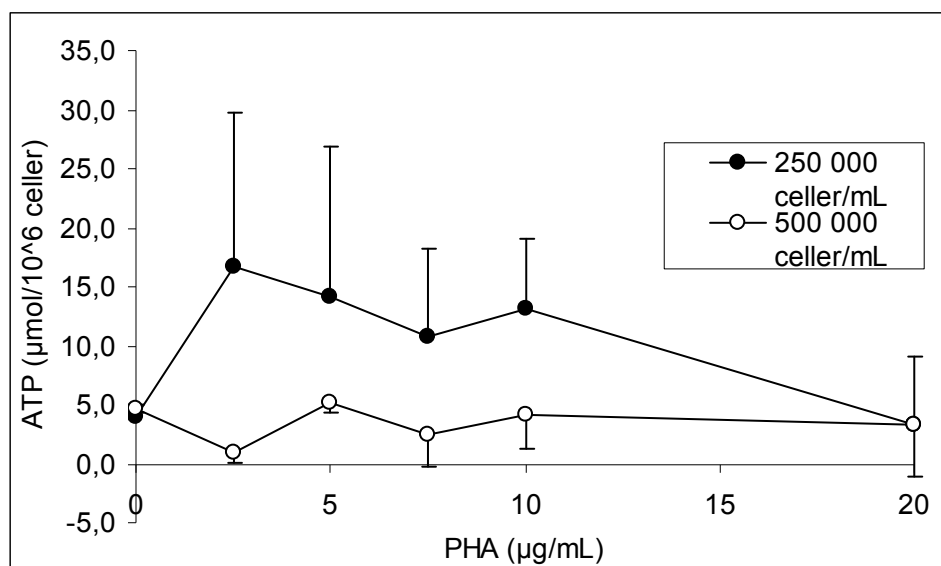
Figur 12. Utprøving av PHA-konsentrasjoner ved aktivering av isolerte PBMC. PHA sluttkonsentrasjoner i brønn 3,00 – 6,00 – 9,00 – 12,0 – 15,0 µg/mL. ATP er målt som markør på aktivering. Mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) fortynnet til 50 000 celler/mL. Inkuberingstid: 21 timer. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

Deretter ble stimulering med ulike PHA-konsentrasjoner (2,5 – 5,00 – 7,50 – 10,0 – 20,0 µg/mL) utprøvd ved to høyere cellekonsentrasjoner av PBMC på 500 000 og 1 000 000 celler/mL. Dette for å se om det trengtes en høyere cellekonsentrasjon for å kunne se en tydelig aktivering. Mediumet X-vivo ble her byttet ut med RPMI 1640 med L-Glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin/streptomycin. Ved cellekonsentrasjonen 500 000 celler/mL ble det målt økt ATP der PHA var tilsatt i sluttkonsentrasjonene 5,00 og 7,50 µg/ml (figur 13).



Figur 13. Utprøving av PHA- og cellekonsentrasjoner ved aktivering av isolerte PBMC. PHA sluttkonsentrasjoner i brønn 2,50 – 5,00 – 7,50 – 10,0 – 20,0 μg/mL. ATP er målt som markør på aktivering. Mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) fortynnet til 500 000 og 1 000 000 celler/mL. Inkuberingstid: 23 timer. Gjennomsnitt av duplikater (standardavvik).

Videre ble et tilsvarende forsøk utført ved cellekonsentrasjoner på 250 000 og 500 000 celler/mL. Se figur 13. Disse cellekonsentrasjonene ble valgt siden det i det forrige forsøket ble sett en tendens til aktivering rundt en PHA-konsentrasjon på 5,00 – 7,50 μg/mL for cellekonsentrasjonen 500 000 celler/mL. I dette forsøket ble det ikke sett noen ATP-økning ved 500 000 celler/mL. Derimot ble det ved 250 000 celler/mL målt økt ATP der PHA var tilsatt i konsentrasjonsområdet 2,50-10,0 μg/mL (figur 14).



Figur 14. Utprøving av PHA- og cellekonsentrasjoner ved aktivering av isolerte PBMC. PHA sluttkonsentrasjoner i brønn 2,50 – 5,00 – 7,50 – 10,0 – 20,0 μg/mL. ATP er målt som markør på aktivering. Mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) fortynnet til 250 000 og 500 000 celler/mL. Inkuberingstid: 23 timer. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

Størrelsen på standardavvikene i disse tre forsøkene indikerte at metodeoppsettet hadde høy impresisjon. I forsøket med 500 000 celler/mL var det relative standardavviket (VK basert på triplikater) median 42 % (min 6 % - maks 141 %). Det relative standardavviket var median 57 % (26 % - 86 %) for målingene i 1 000 000 celler/mL.

5.2.2 Aktivering i fortynnet fullblod

Videre i metodeutviklingen ble det forsøkt å aktivere i fullblod ved hjelp av PHA og via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene, for deretter å kvantifisere ATP i isolerte CD4⁺ celler.

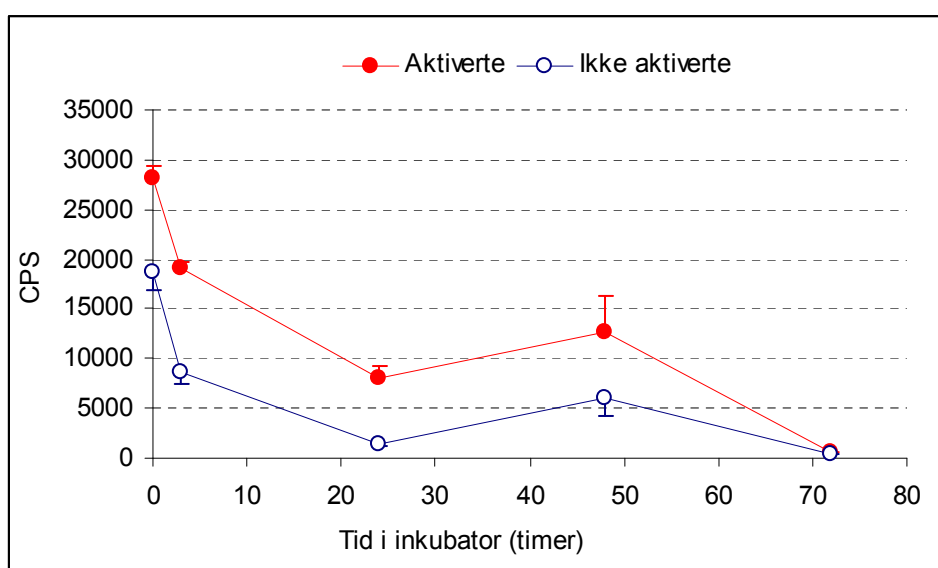
Aktivering med phytohemagglutinin

Det ble forsøkt å aktivere med PHA i fullblod fortynnet med RPMI 1640 m/ L-glutamin, 10 % FBS og 100 U/mL penicillin-streptomycin. PHA ble utprøvd med sluttkonsentrasjon i brønn på 5 μg/mL i de brønnene som skulle aktiveres. Denne konsentrasjonen ble valgt ut i fra de tidligere forsøkene i PBMC. Etter inkubering ble ATP-avhengig luminescens målt i CD4⁺ celler isolert fra det fortynnede fullblodet. Resultater fra to tilsvarende forsøk med blod fra ulike personer er vist i figur 15 og 16. Det ble som forventet målt et høyere nivå av ATP i de

aktiverte CD4+ cellene enn i de ikke-aktiverte i begge forsøkene. Samtidig ble det også målt 23 % og 50 % høyere ATP-nivå ved 0 timer i brønner hvor PHA var tilsatt.

Forsøk 1: Økning av ATP i de aktiverte CD4+ cellene i forhold til i de ikke-aktiverte

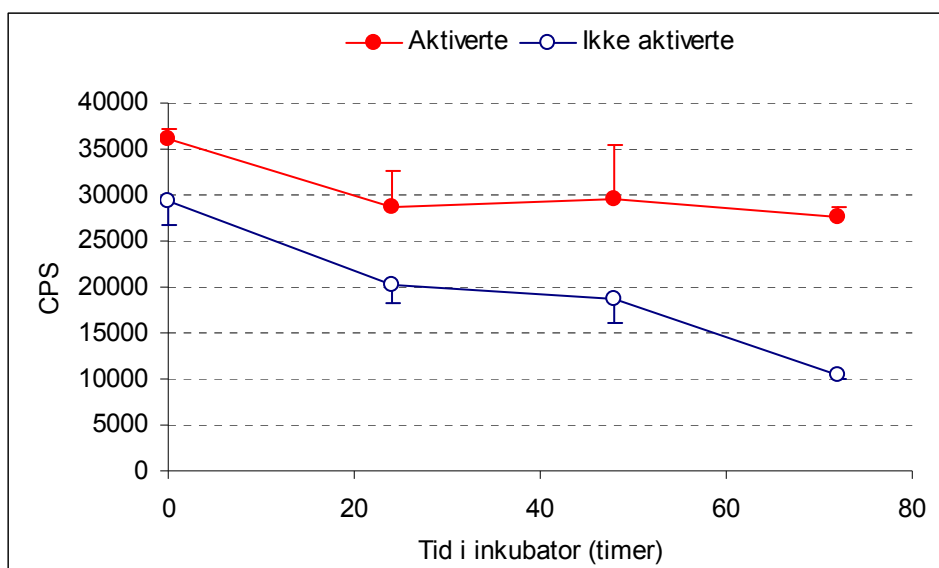
| | |
|----------|-------|
| 0 timer | 50 % |
| 3 timer | 121 % |
| 24 timer | 482 % |
| 48 timer | 109 % |
| 72 timer | 62 % |



Figur 15. Forsøk 1, der ATP-avhengig luminescens ble målt i CD4+ celler etter aktivering i fortynnet fullblod. PHA sluttkonsentrasjon 5 µg/mL. Inkuberingstid: 0 – 3 – 24 – 48 – 72 timer. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

Forsøk 2: Økning av ATP i de aktiverte CD4+ cellene i forhold til i de ikke-aktiverte

| | |
|----------|-------|
| 0 timer | 23 % |
| 24 timer | 41 % |
| 48 timer | 59 % |
| 72 timer | 164 % |

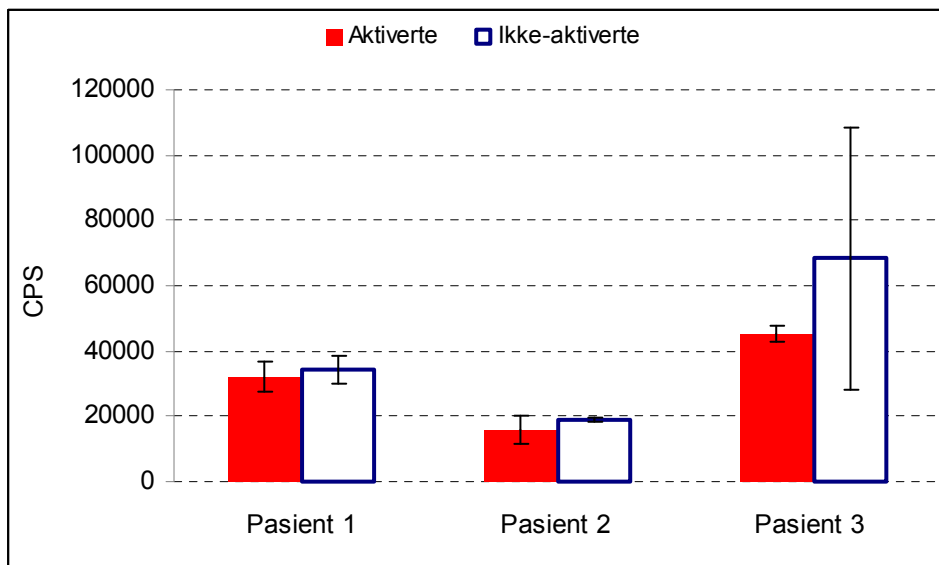


Figur 16. Forsøk 2, der ATP-avhengig luminescens ble målt i CD4⁺ celler etter aktivering i fortynnet fullblod. PHA sluttkonsentrasjon 5 µg/mL. Inkuberingstid: 0 – 24 – 48 – 72 timer. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

Det relative standardavviket (VK basert på triplikater) for målingene i forsøk 1 var median 12 % (min 4 % - maks 30 %), mens det var median 9 % (min 3 % - maks 19 %) i forsøk 2.

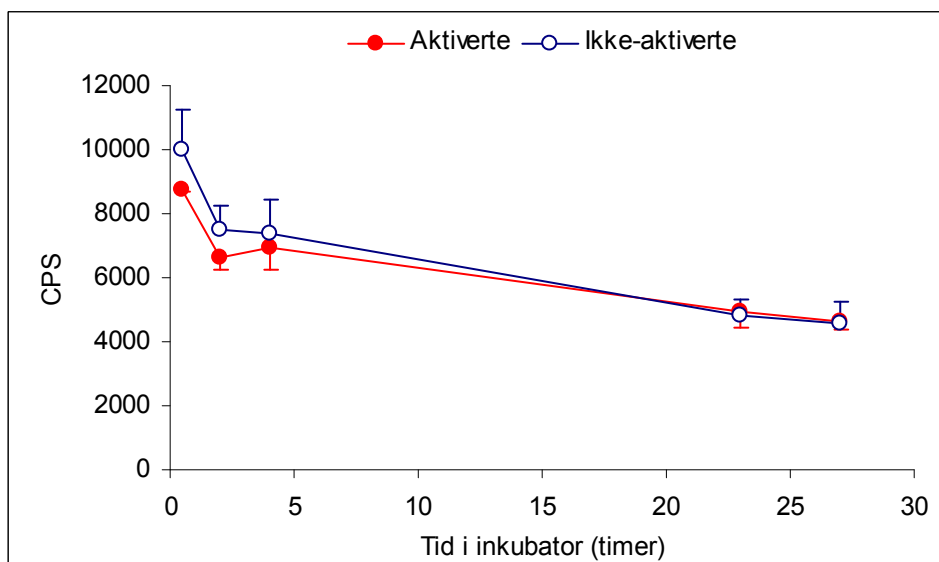
Aktivering via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene

I tillegg ble det forsøkt å aktivere med aktiveringskuler og rekombinant IL-2 via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene i tilsvarende fortynnet fullblod. Etter inkubering ble ATP-avhengig luminescens målt i CD4⁺ celler isolert fra det fortynnede fullblodet. I dette forsøket ble det, motsatt av forventet, sett et marginalt høyere nivå av ATP i de ikke-aktiverede CD4⁺ cellene i forhold til i de aktiverede (figur 17). Det ble i dette forsøket benyttet pasientprøver. Dette innebar at det var varierende mengder immundempende legemidler til stede i prøvene.

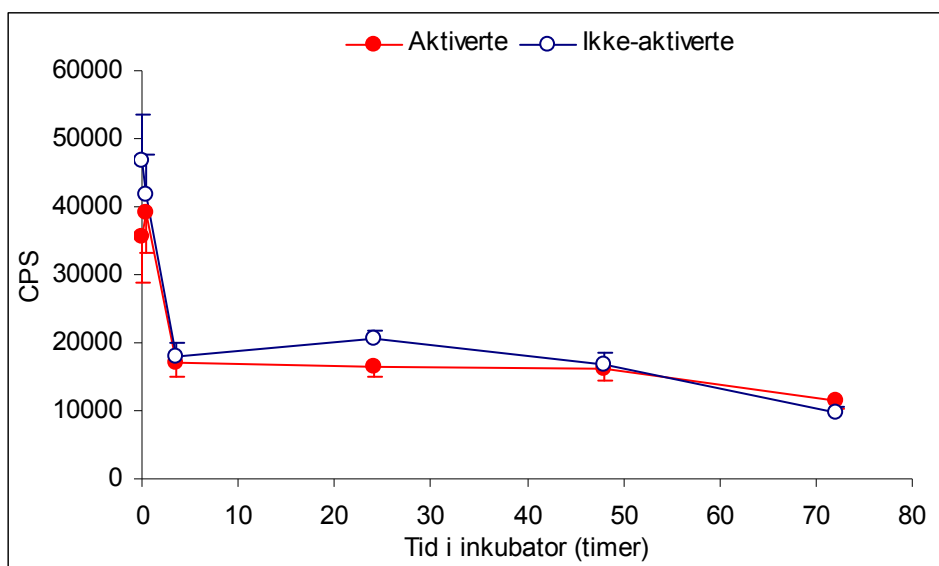


Figur 17. ATP-avhengig luminescens i CD4⁺ celler fra tre ulike individer (pasientprøver). Simultan aktivering i fortynnet fullblod via CD3, CD28 og IL-2-reseptor. Inkuberingstid: 21 timer. Gjennomsnitt av duplikater (standardavvik)

I de neste forsøkene ble det benyttet blod fra friske frivillige, dette for å unngå effekter av immundempende legemidler. I tillegg ble mediumet X-vivo byttet ut med RPMI 1640 m/ L- glutamin med 10 % FBS og lyseringsvæske i forholdet 2:1, i kalibratorrekka for å korrigere for bakgrunnen. I disse forsøkene ble det også målt et litt høyere eller et tilsvarende nivå av ATP i de ikke-aktiverte cellene i forhold til i de aktiverte. Se figur 18 og 19.



Figur 18. ATP-avhengig luminescens i CD4⁺ celler etter simultan aktivering i fortynnet fullblod via CD3, CD28 og IL-2-reseptor. Inkuberingstid: 0,5 – 3 – 4 – 23 – 27 timer. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).



Figur 19. ATP-avhengig luminescens i CD4⁺ celler etter simultan aktivering i fortynnet fullblod via CD3, CD28 og IL-2-reseptor. Inkuberingstid 0 – 0,5 – 3,5 – 24 – 48 – 72 timer. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

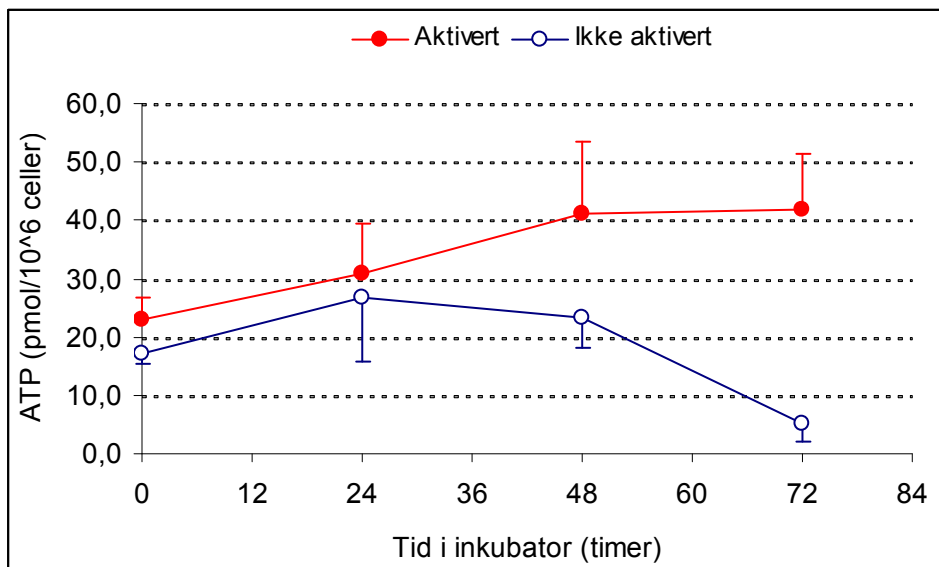
De to siste forsøkene hadde relative standardavvik (VK) på henholdsvis median 10 % (1 % - 14 %) og 10 % (5 % - 23 %).

5.2.3 Aktivering av isolerte CD4⁺ celler via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene

Da forsøk med aktivering i PBMC og fortynnet fullblod ikke gav ønskede resultater, ble det videre forsøkt å aktivere direkte i isolerte CD4⁺ celler ved simultan aktivering via CD3-, CD28- og IL-2-reseptor. De isolerte CD4⁺ cellene ble tilsatt aktiveringskuler med antistoff mot CD3 og CD28. Det ble samtidig tilsatt rekombinant IL-2. Kvantifisering av markørene ATP, WST-1, purinbaser og IMPDH-aktivitet ble foretatt etter inkubering i 0, 24, 48 og 72 timer.

Adenosin 5'-trifosfat som markør

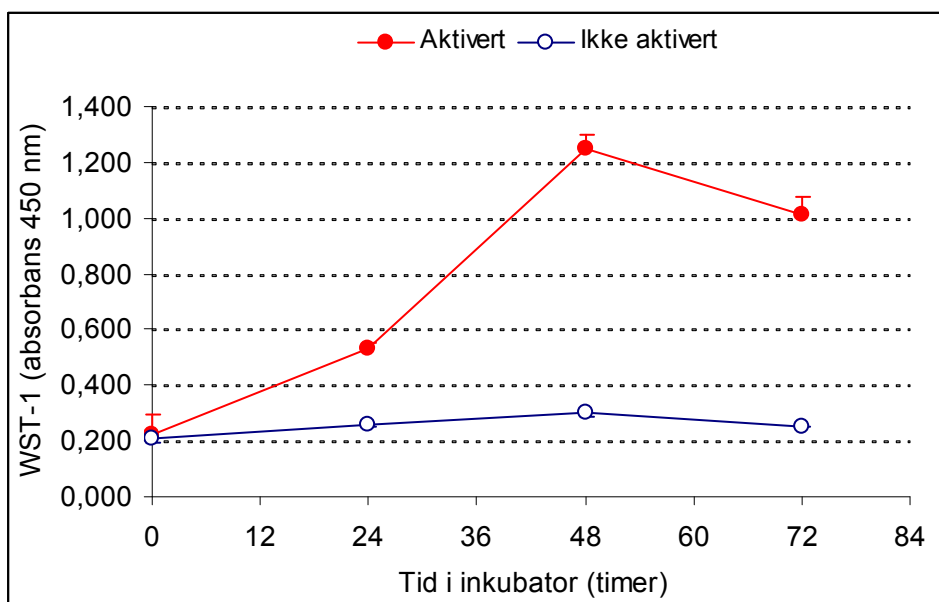
ATP-nivået i de aktiverte CD4⁺ cellene var høyere enn i de ikke-aktiverte. Forskjellen økte med økende inkuberingstid. Ved 48 timers inkubering var ATP 76 % høyere i de aktiverte cellene sammenlignet med de ikke-aktiverte (figur 20). De relative standardavvikene var i området 11,7 - 60,1 %.



Figur 20. ATP målt i aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler. Isolerte celler ble aktivert via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

WST-1 som markør

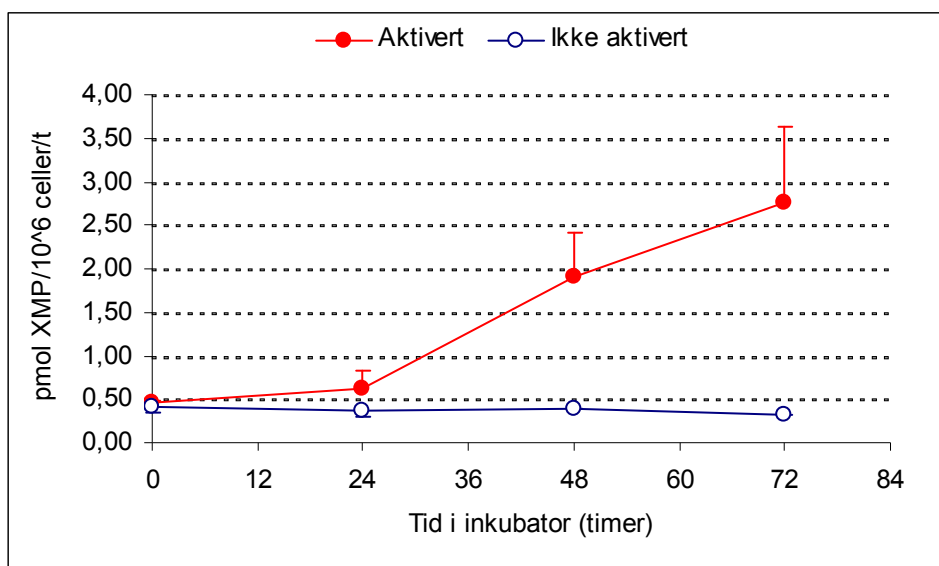
Det ble målt en tydelig økt dannelse av formazan-farge i de aktiverte CD4⁺ cellene i forhold til i de ikke-aktiverte. Intensiteten av formazan-fargen som produseres fra WST-1 korresponderer direkte med økt aktivitet av mitokondrielle dehydrogenaser. Økningen i metabolsk aktivitet i de aktiverte cellene i forhold til de ikke-aktiverte ved 48 timers inkubering, var på 313 % (figur 21). De relative standardavvikene for målingene var i området 0,4 – 34,1 %.



Figur 21. Formazan-farge målt i aktiverte og ikke-aktiverte CD4+ celler. Isolerte celler ble aktivert via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

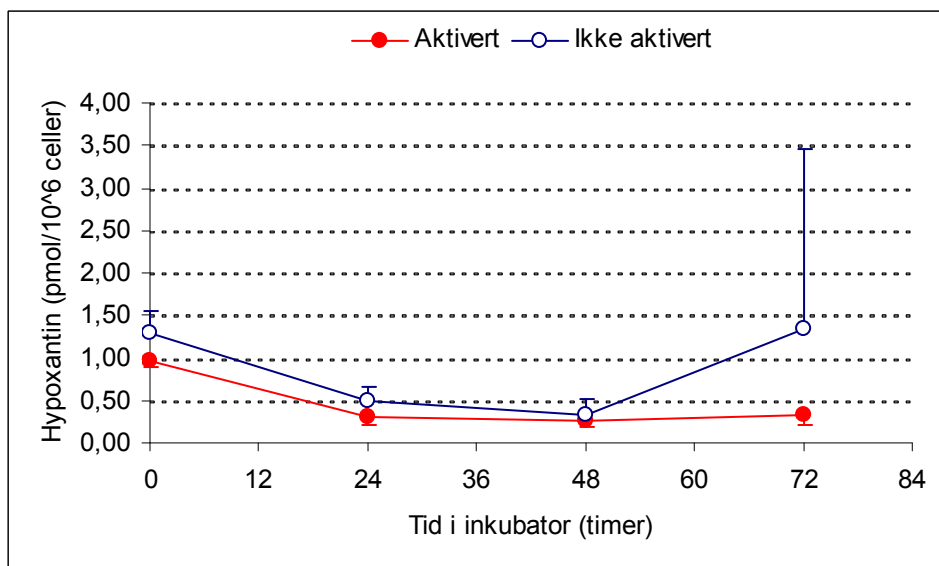
Purinbaser og IMPDH-aktivitet som markører

Kvantifiseringen av xantin ved LC-MS/MS-metoden ble benyttet til å bestemme den maksimale reaksjonshastigheten til IMPDH, der XMP dannes fra IMP i cellelysat tilsatt substrat og kofaktor. Produsert XMP hydrolyseres i laboratoriet til xantin. Ved 48 timers og 72 timers inkubering ble det sett en betydelig høyere og stigende aktivitet av IMPDH i de aktiverte CD4+ cellene i forhold til i de ikke-aktiverte. IMPDH-aktiviteten i de ikke-aktiverte CD4+ cellene holdt seg konstant (figur 22). De relative standardavvikene for målingene var i området 1,0 – 32,3 %.



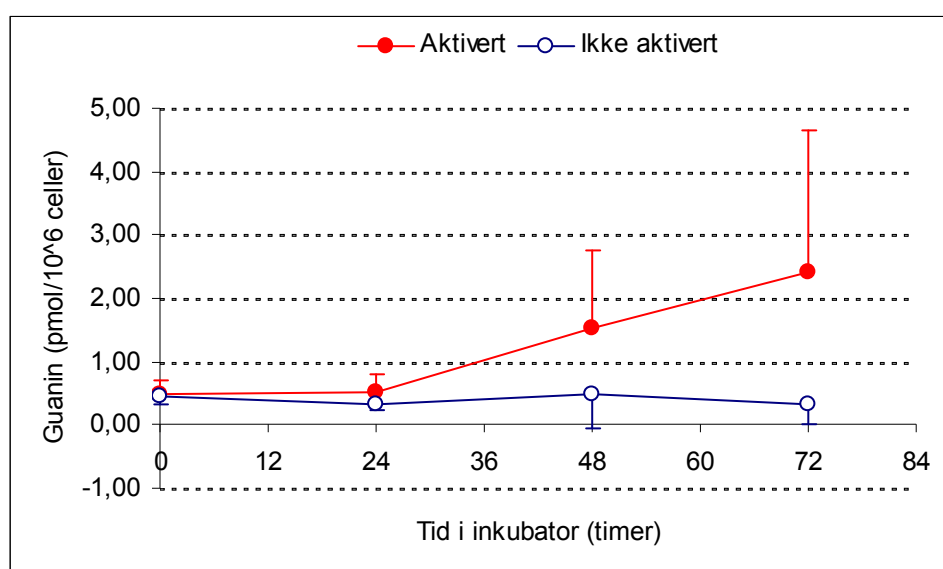
Figur 22. IMPDH aktivitet målt i aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler. Isolerte celler ble aktivert via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

Purinbasene ble kjemisk spaltet fra sine respektive nukleotider i laboratoriet. Det ble ikke sett noen markant forskjell i nivået av hypoxantin mellom de aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ cellene. Tendensen var at hypoxantin ble noe redusert i de aktiverte cellene (figur 23).

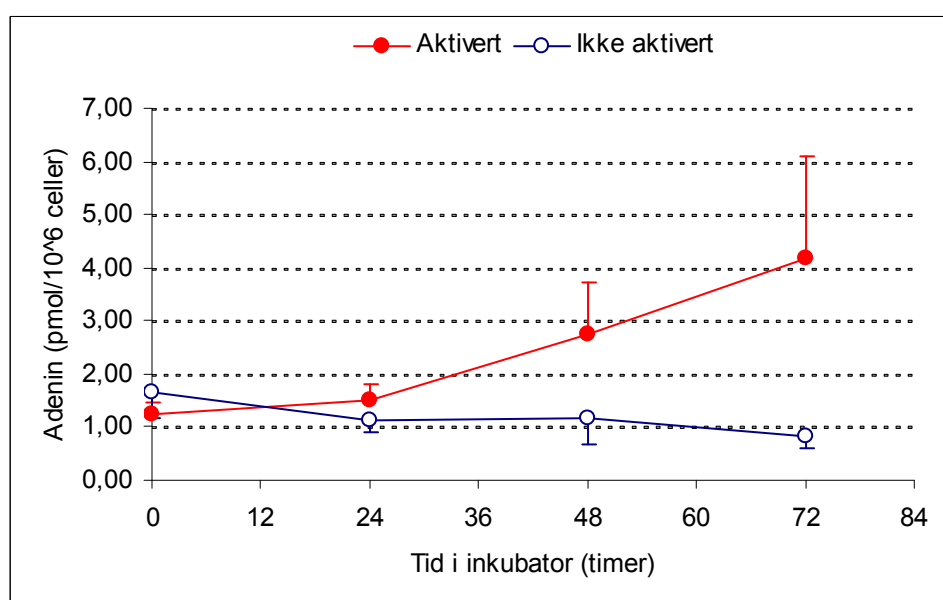


Figur 23. Hypoxantin målt i aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler. Isolerte celler ble aktivert via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

Nivåene av guanin og adenin økte med økende inkuberingstid i de aktiverte CD4+cellene, samtidig som disse purinbasene holdt seg konstant på et lavere nivå i de ikke-aktiverte cellene. Ved 72 timers inkubering økte guanin ca. 6 ganger og adenin økte ca. 4 ganger i de aktiverte cellene i forhold til i de ikke-aktiverte. Se figur 24 og 25. De relative standardavvikene var i området 32,3 – 108,4 % og 17,6 – 45,4 % for henholdsvis guanin- og adeninmålingene.



Figur 24. Guanin målt i aktiverte og ikke-aktiverte CD4+ celler. Isolerte celler ble aktivert via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

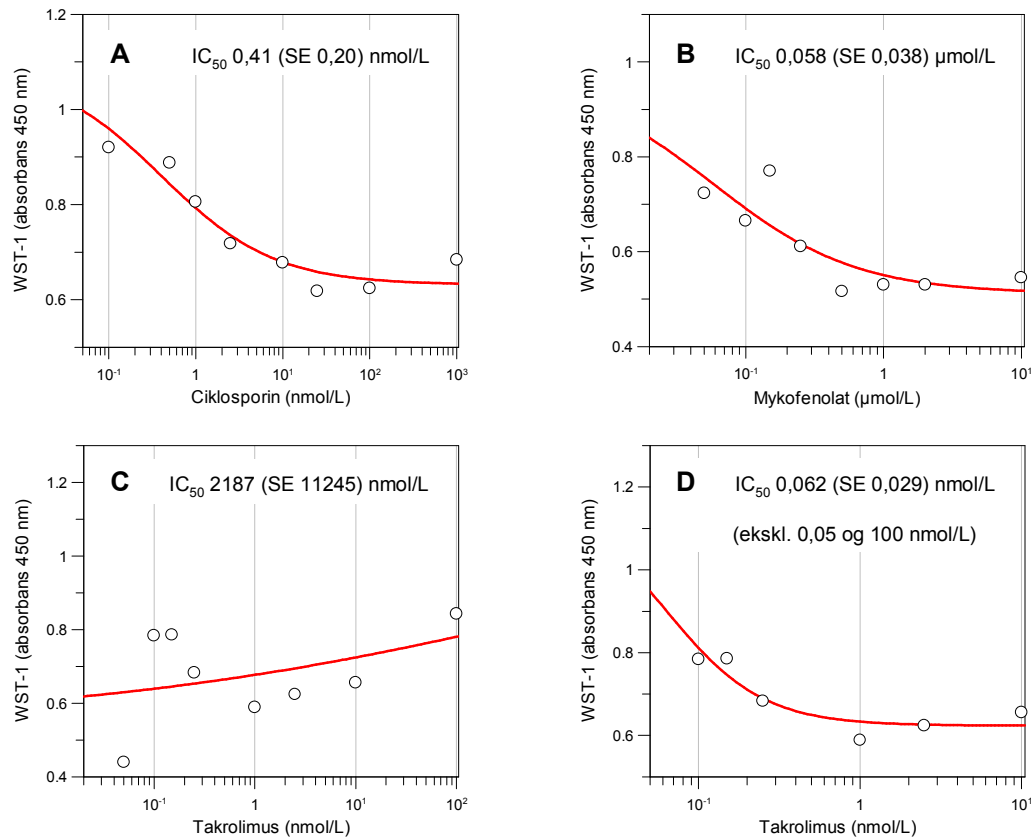


Figur 25. Adenin målt i aktiverte og ikke-aktiverte CD4+ celler. Isolerte celler ble aktivert via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene. Gjennomsnitt av triplikater (standardavvik).

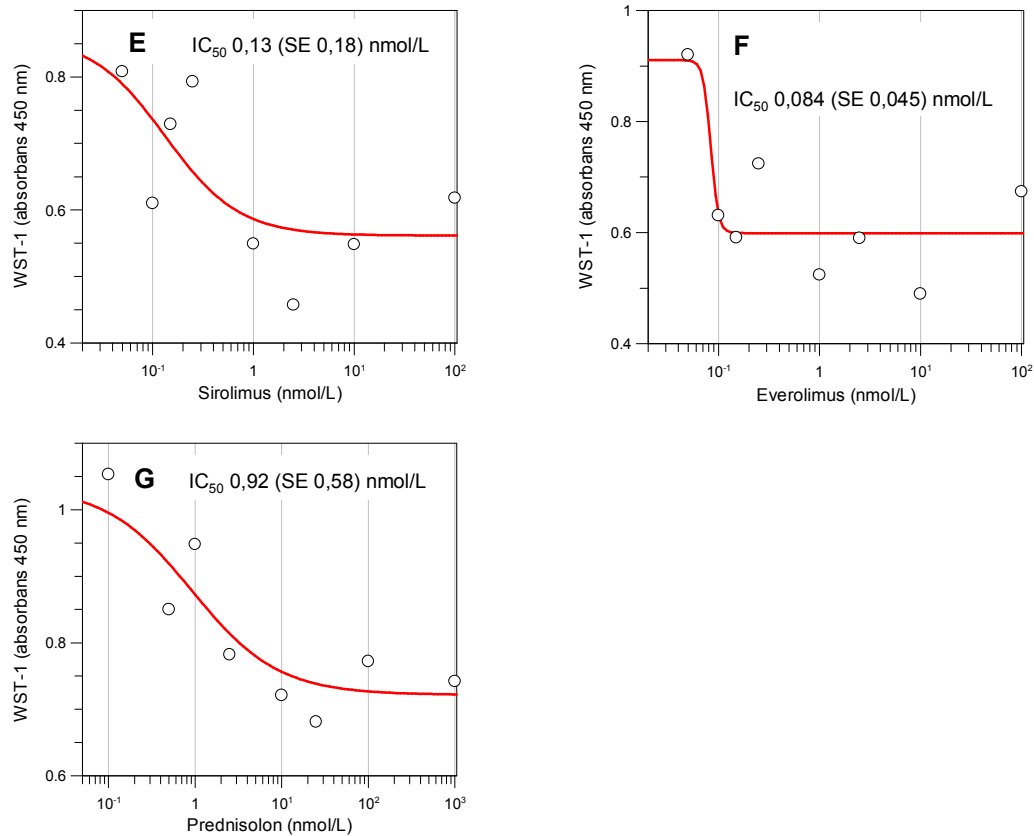
5.4 Utprøving av immundempende legemidlers effekt på aktiveringskapasitet

Det ble i dette forsøket valgt å benytte WST-1 som markør da vi hadde sett stor forskjell mellom aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler, samt en høy presisjon for denne målemetoden i tidligere forsøk. Målemetoden var dessuten mindre tidkrevende enn både kvantifisering av ATP-avhengig luminescens og kvantifisering av IMPDH-aktivitet og purinbasene. I tillegg antok vi at metabolsk aktivitet av mitokondrielle dehydrogenaser kunne regnes som en generell karakteristikk for cellulær aktivitet og proliferasjon. Dermed kunne det være en god farmakodynamisk markør for alle immundempende legemidler, uavhengig av deres virkemekanisme.

Isolerte CD4⁺ celler ble aktivert via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene da cellenes sensitivitet for sirolimus, everolimus og mykofenolat ble testet ut. I forsøkene hvor sensitivitet overfor ciklosporin, takrolimus og prednisolon ble undersøkt, ble cellene kun aktivert via CD3 og CD28-reseptorene. De sistnevnte legemidlenes virkemekanisme medfører reduksjon av IL-2-nivået. Cellene ble aktivert og inkubert med hvert enkelt legemiddel i 48 timer. For alle de immundempende legemidlene ble det observert økende hemming av cellenes metabolske aktivitet (målt ved WST-1) da konsentrasjonen av tilsatt legemiddel økte. Det ble kun gjort en enkelt måling for hver legemiddelkonsentrasjon, og den grafiske presentasjonen indikerte at variasjonen mellom målepunktene var forholdsvis høy. Legemiddelkonsentrasjonen som kreves for å oppnå 50 % hemming (IC₅₀), ble i hvert tilfelle beregnet ved en nonlinear regresjonsanalyse (4-parameter likning for inhibering; GraFit programvare). Resultatene som viser respons vs. konsentrasjon og tilhørende regresjonskurver er vist i figur 26-1 og 26-2.



Figur 26-1. Immundempende legemidlers effekt på aktiveringskapasitet i CD4⁺ celler. Cellene ble aktivert og inkubert med ulike immundempende legemidler i 48 timer. Formazan-farge produsert fra WST-1 ble brukt som markør på mitokondriell dehydrogenaseaktivitet. Respons vs. konsentrasjonskurver og IC_{50} -verdier ble beregnet ved hjelp av GraFit programvare. Ciklosporin, aktivering via CD3/CD28 (A), mykofenolat, aktivering via CD3/CD28 og IL-2-reseptor (B), takrolimus, aktivering via CD3/CD28, alle målingene inkludert (C) og takrolimus, eksklusiv målingene ved 0,05 og 100 nmol/L (D).



Figur 26-2. Immundempende legemidlers effekt på aktiveringskapasitet i CD4⁺ celler. Cellene ble aktivert og inkubert med ulike immundempende legemidler i 48 timer. Formazan-farge produsert fra WST-1 ble brukt som markør på mitokondriell dehydrogenaseaktivitet. Respons vs. konsentrasjonskurver og IC_{50} -verdier ble beregnet ved hjelp av GraFit programvare. Sirolimus, aktivering via CD3/CD28 og IL-2-reseptor (E), everolimus, aktivering via CD3/CD28 og IL-2-reseptor (F) og prednisolon, aktivering via CD3/CD28 (G).

6. Diskusjon

For enkelte legemidler kan den farmakologiske responsen ha høy grad av variasjon mellom individer. I tillegg til å være bestemt av legemidlets konsentrasjonsnivå, vil den individuelle effekt og eventuelle toksisitet også kunne være under påvirkning av andre faktorer. For eksempel kan dette være variabler som alder, kjønn, sykdomstilstand, fysiologiske funksjoner, legemiddelinteraksjoner og polymorfismer i gener som koder for proteiner involvert i legemidlets virkemekanisme. Ved farmakodynamisk monitorering kan man derfor fange opp effekten av flere typer variabilitet sammenlignet med bruk av kun farmakokinetiske målinger.

Transplanterte pasienter bruker kombinasjoner av immundempende legemidler. Underdosering av disse legemidlene kan føre til organavstøtning, og overdosering kan føre til kritiske bivirkninger. Selv om farmakokinetisk monitorering er et godt hjelpemiddel for å balansere den immundempende behandlingen, er det mulig at måling av velegnede responsmarkører ytterligere kan bidra til redusert forekomst av avstøtningsepisoder og bivirkninger.

Formålet med dette delprosjektet var å utvikle en metode for kvantifisering av immuncellers aktiveringskapasitet. Det var ønskelig at målingene av den valgte markøren skulle egne seg til å gradere aktiveringskapasiteten når aktiverte immunceller ble eksponert for immundempende legemidler. For at denne metoden skulle kunne benyttes for ulike typer immundempende legemidler og kombinasjonsbehandling med disse, var det en fordel å finne en legemiddeluspesifikk markør. Kombinasjonsbehandlinger er vanlige hos transplanterte og det kan derfor være en fordel å kunne beskrive den totale immunstatusen til pasientene. Eksempler på slike legemiddeluspesifikke markører som tidligere er undersøkt er lymfocytproliferasjon, uttrykk av IL-2 (30) og intracellulær ATP (31).

6.1 Utprøving av metodene

Strategien for metodeutviklingen var å etablere en egnet metode for *ex vivo* aktivering av immunceller, og samtidig finne en markør som kunne beskrive aktiveringsgraden. Ulike cellematerialer, aktiveringsprinsipper og markører ble undersøkt. Forutsetninger som lå til

grunn for en velegnet metode, var at de resulterende målingene viste tydelige og konsistente utslag på aktivering, samt at de hadde tilfredsstillende presisjon. Siden måling av biologiske responser krever forholdsvis komplekse metodeoppsett, ble variasjonskoeffisienter under ca. 20 % skjønnsmessig vurdert å være akseptabelt. Dette innebar noe høyere impresisjon enn hva som vanligvis godtas ved konsentrasjonsmålinger av legemidler i blod eller plasma ($VK < 10-15 \%$). I tillegg var det en målsetning å komme frem til en metode som var så enkel som mulig med hensyn til teknisk utførelse.

De første forsøkene som ble gjort for å teste kvantifisering av ATP, pekte sterkt i retning av at lineære og reproducerbare ATP-målinger med høy presisjon kan gjøres i PBMC. LC-MS/MS-metoden som ble brukt for å kvantifisere purinbaser og IMPDH-aktivitet hadde også god presisjon og nøyaktighet. Den innledende vurderingen av målemetodenes pålitelighet gjaldt imidlertid kun kvantifisering av de potensielle markørene. Det måtte videre undersøkes hvordan markørene egnet seg i metodeoppsettene for cellulær aktivering. WST-1 er en markør som kun kan testes ut i celler. De første målingene av aktiviteten til mitokondrielle dehydrogenaser med WST-1 som markør, hadde god presisjon og viste seg å være lite påvirket av reagensene som ble brukt i metoden.

Aktivering av PBMC ved inkubering med PHA resulterte ikke i en aktiveringsmetode som gav tydelige, konsistente resultater og god nok presisjon. Utprøving av lengre inkuberingstid (48 timer eller 72 timer) kunne ha vært en måte å prøvd ut denne metoden videre. I tillegg ville det være nødvendig å videreutvikle metodeprinsippet for å oppnå bedre presisjon for ATP-målingene. En mulig kilde til lav presisjon kan være høy variasjon i mengden celler som ble overført fra brønn i inkuberingsbrett til brønn i avlesningsbrett. Forbedringer kunne ta sikte på å få til en teknisk utførelse der hele metoden gjennomføres i samme brett.

Aktivering i fortynnet fullblod med PHA og etterfølgende isolering av CD4⁺ celler gav som forventet et høyere ATP-nivå i de aktiverte i forhold til i de ikke-aktiverte. Samtidig ble det observert et høyere ATP-nivå allerede ved 0 timer i brønner hvor PHA var tilsatt, noe som tyder på en svakhet med metoden. Det kan skyldes at tilsetningen av PHA straks gjør at celler aggregerer. Andre lymfocytter kan henge seg på de CD4⁺ cellene ved kryssbinding mellom cellene mediert av PHA. Dette kan resultere i et høyere utbytte av isolerte CD4⁺ celler. Dersom dette er tilfelle, kan også andre lymfocyttopulasjoner bli med under isoleringen. Denne metoden som inkluderte aktivering av T-celler i fortynnet fullblod ved hjelp av PHA,

hadde en akseptabel presisjon på ATP-målingene. Likevel er det en svakhet at man ikke vet hvilket antall celler man har fått isolert fra hver enkelt prøve. Isoleringsutbyttet vil sannsynligvis variere fra blodprøve til blodprøve ut ifra at det opprinnelige celletallet i prøvematerialet vil være varierende fra individ til individ. Dersom man måler relativ aktiveringskapasitet i aktiverte vs. ikke-aktiverte celler, vil man likevel kunne korrigere for problemet med ukjent og variabelt celletall.

Aktiveringmetoden i fortynnet fullblod via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene hadde en akseptabel presisjon på ATP-målingene. Ingen av forsøkene førte imidlertid til en målbar aktivering. Aktiveringskulenes tiltenkte bruk er aktivering av isolerte T-celler. Det er usikkert hvordan aktiveringskulene virker i fortynnet fullblod. Det er i tillegg mulig at aktiveringskulene interfererte med CD4-isoleringsskulene som etterpå ble tilsatt. Redusert isoleringsutbytte kan dermed ha påvirket ATP-nivået i negativ retning for brønnene som ble tilsatt aktiveringskuler. I forsøket hvor det ble benyttet blod fra pasienter, inneholdt prøvene varierende mengder av ulike immundempende legemidler som kan ha påvirket resultatene.

Hverken aktivering i PBMC eller i fortynnet fullblod gav ønskede resultater. Metoden for aktivering av isolerte CD4⁺ celler via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene gav derimot tydelige utslag på markørene som ble undersøkt. Ved denne metoden viste kvantifiseringen av markøren ATP høyere nivåer i de aktiverte i forhold til i de ikke-aktiverte cellene, men målingene hadde høye relative standardavvik. For å kunne benytte disse ATP-målingene videre måtte man ha sett på mulige svakheter med metoden og prøvd ut endringer. Det er mulig at det for parallellene ble tatt ut en ulik andel av de inkuberte CD4⁺ cellene fra brønnene. Et forbedringsforslag kunne være å undersøke om det er mulig å redusere antall overføringstrinn i metodeoppsettet. Kvantifiseringen av WST-1 som markør etter aktivering via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene, resulterte i en bedre og akseptabel presisjon, samt en stor forskjell mellom aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler. Fra kvantifiseringen av IMPDH-aktivitet ble det sett en tendens til betydelig høyere og stigende aktivitet av IMPDH i de aktiverte i forhold til i de ikke-aktiverte CD4⁺ cellene hvor IMPDH-aktiviteten holdt seg konstant. For purinbasen hypoxantin ble det ikke sett noen markant nivåforskjell mellom de aktiverte og de ikke-aktiverte CD4⁺ cellene. Derimot gav aktiveringen økte og stigende nivåer av purinbasene guanin og adenin. IMP er et mellomprodukt i purinsyntesen. Når aktiveringen fører til økt IMPDH-aktivitet og produksjon av guaninnukleotider, samt at produksjonen av adeninnukleotider øker, vil samtidig forbruket av IMP øke. Dette er en mulig grunn til at

nivået av hypoxantin (som deriveres fra IMP ved kjemisk hydrolyse) ikke økte i de aktiverte cellene, men heller viste en tendens til reduksjon. Målingene av IMPDH-aktivitet og purinbasene ved LC-MS/MS-metoden hadde høye relative standardavvik. En forklaring kan være stor variasjon i andel celler som ble overført fra brønner i inkuberingsbrett til mikrosentrifugerør, samt at man kan ha tapt varierende mengder celler ved å vaske dem i PBS. En mulig løsning kunne være å relatere målingene av purinbaser til en annen cellulær markør som holder seg på konstant nivå ved aktivering av cellene.

6.2 Utprøving av immundempende legemidlers effekt på aktiveringskapasitet

Det ble valgt å bruke WST-1 som markør i forsøket hvor vi prøvde ut de immundempende legemidlenes effekt på aktiveringskapasiteten i isolerte CD4⁺ celler. Vi antok at metabolsk aktivitet av mitokondrielle dehydrogenaser kunne regnes som en generell karakteristikk av cellulær aktivitet og proliferasjon. WST-1 kunne være en god farmakodynamisk markør for alle de immundempende legemidlene siden denne markøren gjenspeiler cellenes metabolske aktivitet uavhengig av legemidlenes virkemekanisme. I tidligere forsøk hadde vi sett en stor forskjell mellom aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler, samt en høy presisjon for denne målemetoden.

For alle de immundempende legemidlene ble det observert økende hemming av cellenes metabolske aktivitet (målt ved WST-1) ved økende legemiddelkonsentrasjoner. Det ble kun gjort en enkelt måling for hver legemiddelkonsentrasjon, og den grafiske presentasjonen indikerte at variasjonen mellom målepunktene var forholdsvis høy. Flere utprøvende forsøk må gjennomføres for å forbedre metodens presisjon. Endringer som kan prøves ut: tilsetningsvolum av legemiddel kan økes til et større volum enn 1 µL og to eller tre paralleller kan tas med for hver legemiddelkonsentrasjon. Man bør også teste ut om legemidlene i seg selv påvirker absorbansen av formazan eller bakgrunnsabsorbansen ved 450 nm. Det var en tendens til at kurvene ikke flatet ut, men i stedet økte noe ved de høyeste legemiddelkonsentrasjonene. Dersom dette er reproducerbart kan påvirkning av bakgrunnsabsorbans være en mulig forklaring, noe som sannsynligvis kan korrigeres for. Dette forsøket indikerte likevel at det kan være mulig å få et slikt metodeprinsipp til å fungere i praksis.

Kalkulerte IC_{50} -verdier for de immundempende legemidlenes hemming av cellulær aktiveringskapasitet kan være et relevant mål på individuell sensitivitet for hvert enkelt immundempende legemiddel (20). Legemiddelkonsentrasjonene som gir hemmende effekt i forsøket vi utførte og andre *ex vivo*-forsøk, vil sannsynligvis være ulike konsentrasjonsnivåene som gir hemmende effekt *in vivo*. IC_{50} -verdiene kan kun brukes som forholdstall for å sammenligne pasientenes individuelle sensitivitet for hvert enkelt immundempende legemiddel. Det er mulig nytten av T-celle sensitivitetstesting er størst i forkant av en transplantasjon. Kurata *et al.* hevder at individuell legemiddelsensitivitet kan bli forhøyet etter en transplantasjon og medfølgende immundempende behandling, i forhold til nivået før transplantasjonen. Kvantifisering av immuncellers aktiveringskapasitet etter transplantasjon, som mål på pasientens immunstatus, er en mulighet ved siden av å teste legemiddelsensitivitet før transplantasjon. Men en begrensning ved frekvent immunmonitorering vil være at det er svært ressurskrevende (20).

Den kliniske nytteverdien må dokumenteres før en potensiell sensitivitetstest eller farmakodynamisk monitoreringsmetode for immundempende legemidler kan tas i bruk blant transplanterte. I første omgang bør man undersøke hvordan målingene korrelerer med kliniske hendelser i en relevant pasientpopulasjon. Deretter må man eventuelt utføre studier hvor man undersøker om bruk av metoden gir informasjon som bidrar til forbedret pasientbehandling. I tillegg må analysemetodens presisjon, tekniske kompleksitet, tidsforbruk og kostnader tas med i betraktningen når det skal vurderes om metoden skal innføres til klinisk bruk.

7. Konklusjon

Aktivering via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene i isolerte CD4⁺ celler med etterfølgende kvantifisering av cellenes metabolske aktivitet ved hjelp av WST-1, viste seg å være den metoden som gav høyest presisjon i målingene og størst forskjell mellom nivået i aktiverte og ikke-aktiverte celler. Mitokondriell dehydrogenaseaktivitet i *ex vivo* aktiverte T-celler kan være en god farmakodynamisk markør for alle de immundempende legemidlene, siden denne markøren gjenspeiler cellenes sensitivitet uavhengig av legemidlenes virkemekanisme.

Aktivering av isolerte PBMC ved hjelp av PHA gav ikke tydelige og konsistente utslag på målt nivå av ATP. I tillegg var målevariasjonen høy for dette metodeoppsettet. Aktivering av T-celler i fortynnet fullblod, med etterfølgende isolering av CD4⁺ celler og kvantifisering av ATP, gav tilfredsstillende målepresisjon. Her var det likevel en svakhet at PHA-tilsetningen økte det målte ATP-nivået også før inkubering, noe som kunne skyldes at utbytte og renhet av isolert cellepopulasjon ble påvirket. Tilsetning av CD3/CD28-aktiveringskuler og IL-2 i fortynnet fullblod medførte ikke økt ATP-nivå i CD4⁺ celler. Aktivering av isolerte CD4⁺ celler via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene gav økt ATP-nivå, økt IMPDH-aktivitet og økte nivåer av guanin og adenin. Imidlertid var målepresisjonen lav, og det er sannsynlig at IMPDH og guanin vil være selektive markører for mykofenolat.

Prinsippet for å aktivere isolerte CD4⁺ celler via CD3, CD28 og IL-2-reseptorene og så kvantifisere metabolsk aktivitet ved hjelp av WST-1, ble valgt til å prøves ut videre. Ved å bruke denne metoden ble immundempende legemidlers hemmende effekt på aktiveringskapasiteten til CD4⁺ celler demonstrert. Resultatene indikerte at dette prinsippet kan være mulig å få til i praksis slik at pasienters sensitivitet for immundempende legemidler kan testes. Videre bør presisjonen på responskurvene forbedres.

Det er for tidlig å fastslå om det foreslåtte prinsippet kan brukes til å bestemme farmakodynamikken hos transplanterte pasienter. Etter at man har kommet frem til en metode som teknisk fungerer og er validert, er det neste trinnet å undersøke hvordan metodens resultater henger sammen med klinisk utfall hos pasientene. Til slutt må klinisk nytteverdi av den farmakodynamiske monitoreringen undersøkes.

Kildeliste

1. Bogen, B., Munthe, L.A. (2000). "Immunologi." Universitetsforl., Oslo.
2. Parham, P., Janeway, C.A. (2009). "The immune system." Garland Science, London.
3. Thorsby, E. (2006). "Norsk transplantasjonsmedisin gjennom 50 år." Tidsskr Nor Laegeforen. 126: 3305-3310.
4. Scandiatransplant. www.scandiatransplant.org, tilgjengelig 15.10.2010.
5. Store norske leksikon. www.snl.no, tilgjengelig 15.10.2010.
6. Vartdal, F., Thorsby, E. (1999). "Immunologiske reaksjoner ved transplantasjoner." Tidsskr Nor Laegeforen. 119: 3167-3170.
7. Foreningen for utgivelse av norsk legemiddelhåndbok (2010). "Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell." Oslo.
8. Oslo universitetssykehus. <http://www.nephro.no/foreningsnytt/Tx-Protokoll-total-2010.pdf>, tilgjengelig 15.08.2010.
9. Augustine, J.J., Bodziak, K.A., Hricik, D.E. (2007). "Use of sirolimus in solid organ transplantation." Drugs. 67: 369-391.
10. Flechner, S.M. (2009). "Sirolimus in kidney transplantation indications and practical guidelines: de novo sirolimus-based therapy without calcineurin inhibitors." Transplantation. 87: S1-S6.
11. Staatz, C.E., Tett, S.E. (2007). "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients." Clin Pharmacokinet. 46: 13-58.
12. Allison, A.C., Eugui, E.M. (2005). "Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection." Transplantation. 80: S181-S190.
13. Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M., Haussler, U. (2005). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids." Clin Pharmacokinet. 44: 61-98.
14. Oslo universitetssykehus. <http://www.rikshospitalet.no/ikbViewer/Content/413563/Leverprotokollen.pdf>, tilgjengelig 15.08.2010.
15. Wang, J. (2009). "CYP3A polymorphisms and immunosuppressive drugs in solid-organ transplantation." Expert Rev Mol Diagn. 9: 383-390.
16. Oellerich, M., Armstrong, V.W. (2006). "The role of therapeutic drug monitoring in individualizing immunosuppressive drug therapy: recent developments." Ther Drug Monit. 28: 720-725.

17. Kowalski, R., Post, D., Schneider, M.C., Britz, J., Thomas, J., Deierhoi, M., et al. (2003). "Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management." *Clin Transplant*. 17: 77-88.
18. Rowland, M., Tozer, T.N. (1995). "Clinical pharmacokinetics: concepts and applications." Williams & Wilkins, Baltimore.
19. Ohdan, H. (2010). "Quantification of T-cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients." *Clin Pharmacol Ther*. 87: 23-26.
20. Kurata, Y., Kato, M., Kuzuya, T., Miwa, Y., Iwasaki, K., Haneda, M., et al. (2009). "Pretransplant pharmacodynamic analysis of immunosuppressive agents using CFSE-based T-cell proliferation assay." *Clin Pharmacol Ther*. 86: 285-289.
21. Hirano, T. (2007). "Cellular pharmacodynamics of immunosuppressive drugs for individualized medicine." *Int Immunopharmacol*. 7: 3-22.
22. Kobashigawa, J.A., Kiyosaki, K.K., Patel, J.K., Kittleson, M.M., Kubak, B.M., Davis, S.N., et al. (2010). "Benefit of immune monitoring in heart transplant patients using ATP production in activated lymphocytes." *J Heart Lung Transplant*. 29: 504-508.
23. Chilson, O.P., Kelly-Chilson, A.E. (1989). "Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes." *Eur J Immunol*. 19: 389-396.
24. Kruisbeek, A.M., Shevach, E., Thornton, A.M. (2004). "Proliferative assays for T cell function." *Curr Protoc Immunol*. Chapter 3: Unit.
25. Perles, B., Flanagan, M.T., Auger, J., Crumpton, M.J. (1977). "Mechanism of lymphocyte activation: the binding of phytohemagglutinin to the lymphocyte surface." *Eur J Immunol*. 7: 613-619.
26. Baran, J., Kowalczyk, D., Ozog, M., Zembala, M. (2001). "Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation." *Clin Diagn Lab Immunol*. 8: 303-313.
27. Perkin Elmer (2008). "Prosedyrebeskrivelse, ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System."
28. Vethe, N.T., Mandla, R., Line, P.D., Midtvedt, K., Hartmann, A., Bergan, S. (2006). "Inosine monophosphate dehydrogenase activity in renal allograft recipients during mycophenolate treatment." *Scand J Clin Lab Invest*. 66: 31-44.
29. Vethe, N.T., Bergan, S. (2006). "Determination of inosine monophosphate dehydrogenase activity in human CD4+ cells isolated from whole blood during mycophenolic acid therapy." *Ther Drug Monit*. 28: 608-613.
30. Bohler, T., Nolting, J., Kamar, N., Gurragehaa, P., Reisener, K., Glander, P., et al. (2007). "Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans." *Ther Drug Monit*. 29: 77-86.

31. Millan, O., Sanchez-Fueyo, A., Rimola, A., Guillen, D., Hidalgo, S., Benitez, C., et al. (2009). "Is the intracellular ATP concentration of CD4+ T-Cells a predictive biomarker of immune status in stable transplant recipients?" *Transplantation*. 88: S78-S84.